

# 博士学位論文

EGFP 発現プラスミド DNA に対する  
照射環境に依存した損傷生成の評価と  
これを導入した細胞のライブセル観察による  
DNA 修復難易性の研究

令和5年3月

茨城大学大学院理工学研究科  
量子線科学専攻

小畑 結衣

## 論文要旨

電離放射線は、生体内に様々な化学的変異（損傷）を与えることが知られている。特に細胞核内の DNA には一本鎖切断（SSB）、二本鎖切断（DSB）、塩基損傷、AP サイトなどの様々な損傷が誘発されるが、これらの大部分は酵素的に速やかに修復される。一方損傷が難修復性である場合、細胞死や突然変異などの遺伝的な変異や不安定性の原因となることが指摘されている。本研究では放射線の線質及び試料環境の違いが、生じた DNA 損傷の修復の難易性にどのような違いを与えるかを明らかにすることを目的とした。

DNA 以外の細胞内小器官への放射線影響を除外した上で DNA 修復反応のみを抽出するため、*in vitro* で放射線を DNA に照射した後に非照射の哺乳動物細胞に導入し、修復効率を評価する手法を開発した。緑色蛍光タンパク質（EGFP）遺伝子をコードするプラスミド DNA を試料とし、放射線照射した後ヒト乳がん由来の細胞（MCF-7）及びその正常細胞（MCF-10A）にリポフェクション法により導入した。蛍光顕微鏡を用いてタイムラプスイメージングにより細胞をライブセル観察し、EGFP 発現細胞数の経時変化を調べ、線量に対する発現細胞数の減少を DNA 修復の阻害を示す指標として評価した。さらに、アガロースゲル電気泳動により、損傷のない元のプラスミド DNA 画分である Closed Circular form（以下、CC と略記）のバンド強度を定量し、線量に対する CC 量の減少を片対数プロットすることにより、平均 1 ヒットにより DNA 鎖切断を与える  $D_{37}$  用量（ $1/e$  線量）を決定した。この線量を基準に、異なる線質・異なる試料内水分子条件下における EGFP 発現効率の比較を行った。

先行研究（未発表データ）では、10mM Tris-1mM EDTA 緩衝液（ $1 \times TE$ ）中に溶解したプラスミド DNA に対して、2 種類の X 線（150 kVp（ $LET \sim 2 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ）、及び 58 kVp（ $LET > 2 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ））を照射した DNA 鎖切断効率は管電圧に依存して高くなる一方で、 $1/e$  線量における EGFP 発現効率は両者でほぼ同じであり、生成した DNA 損傷自体

の修復効率は同程度であると示唆された。以上から、入射 X 線のエネルギーより、トラックエンドにおける低エネルギー二次電子及び照射中バルク水に生じる OH ラジカル等が DNA 修復の難易性と強く相関するのではないかと考えた。これを調べるために OH ラジカルによる間接効果を抑え放射線トラックの直接作用の効率を相対的に増やした上でその効果を評価するため、水和プラスミド DNA 試料に対する 150 kVp-X 線照射を行った。EGFP 発現効率は水溶液中に比べ若干減少したことから DNA 損傷の難易性に水和水が関係していると推測された。X 線誘発 SSB とニッキング酵素で誘発した SSB と比較したところ、前者の方が圧倒的に難修復性であることが明らかとなった。これらの結果から、直接、間接の両効果とも DNA の切断端に放射線特有の化学構造を誘発することで修復の難易性に寄与すると考えられる。

放射光施設の単色軟 X 線を利用することで、DNA 主鎖のみに含まれるリン原子に対し大きな吸収断面積（吸収確率）を持つ K 殻の共鳴光電効果を調べることができる。リン原子に特異的にエネルギーを付与すると、主鎖切断を含む難修復性の DNA 損傷が生成されると予測される。軟 X 線は物質中での透過力が小さいため、プラスミド DNA の乾燥薄膜を試料とし、これにリン K 殻共鳴ピークエネルギー (2.153 keV) を照射した。その結果、他のエネルギーと比較して DNA 鎖切断効率自体は低いが逆に難修復性であることが示された。以上から DNA 分子骨格のリン K 殻共鳴励起は、難修復性損傷誘発の主要因となり得ることが示された。

がんの放射線治療にも用いられている  $C^{6+}$  イオンビーム（線エネルギー付与 (Linear Energy Transfer、以下 LET と略す): 76.9 keV/ $\mu\text{m}$ ) をプラスミド DNA 水溶液に照射し、高い LET の効果を調べた。高 LET 放射線は DSB など難修復性の損傷を高頻度で誘発するとされているが、実際に生じた損傷と細胞内修復応答との相関は不明な点が多い。予想通り X 線と比較すると EGFP 発現効率は小さく、難修復性の損傷が生じることが明らかとなった。また溶液中のラジカルスキャベンジャー濃度を変えた時の

EGFP 発現効率の違いから、損傷の難修復性に OH ラジカルによる間接効果が大きく寄与することが示唆された。

さらに EGFP 発現と DSB 部位の相関を検討するために、制限酵素により DSB を人工的に導入したプラスミド DNA に対する検討も行った。DSB は遺伝的影響に直接関連する重篤な損傷であるとされており、EGFP 発現効率は大きく低下すると予想される。認識配列の異なる制限酵素を用いて“モデル DSB”を作成し、直鎖形状のプラスミド DNA の EGFP 発現効率を比較したところ、コントロール（閉環状構造の場合）の数%~30%程度の EGFP 発現が認められた。このことから、一定程度の DSB 末端の再結合が行われるかあるいは直鎖のまま EGFP 発現が起こっていることが推測された。また、EGFP 遺伝子と DSB サイトの距離が遠いほど発現効率が高く DSB サイト依存性が示された。

本研究で開発した手法を用いた以上の研究を通じ、放射線の線質及び試料内水分子環境の違い、あるいは損傷部位の化学構造や標的遺伝子からの距離が、DNA 修復の難易性と強い相関を持つことを初めて明らかにすることができた。

## 目次

序論.....	1
第一章 様々な放射線照射により誘発された DNA 損傷と遺伝子発現への影響.....	3
1.1 背景と目的.....	4
1.2 材料と方法.....	10
1.2.1 細胞株とプラスミド DNA.....	10
1.2.2 プラスミド DNA の精製と解析.....	18
1.2.3 プラスミド DNA への放射線照射.....	18
1.2.4 トランスフェクション.....	38
1.2.5 タイムラプス撮影.....	38
1.2.6 蛍光顕微鏡撮影写真の解析.....	40
1.3 結果.....	41
1.3.1 ヒト乳腺由来の正常細胞とがん細胞の EGFP 発現細胞率の違い.....	41
1.3.2 EGFP 遺伝子の発現の照射時の水分子環境の違い.....	44
1.3.3 硬 X 線照射したプラスミド DNA の非照射細胞における EGFP 遺伝子の発現.....	49
1.3.4 軟 X 線照射したプラスミド DNA の非照射細胞における EGFP 遺伝子の発現.....	56
1.3.5 Ne <sup>10+</sup> 線を照射したプラスミド DNA の非照射細胞内における EGFP 遺伝子の発現.....	61
1.3.6 C <sup>6+</sup> 線を照射したプラスミド DNA の非照射細胞内における EGFP 遺伝子の発現.....	66
1.4 考察.....	72
第二章 細胞内における線状化 DNA の細胞内遺伝子発現の低減.....	78
2.1 背景と目的.....	79
2.2 材料と方法.....	81
2.2.1 プラスミド DNA への酵素処理.....	82
2.2.2 酵素処理したプラスミド DNA からの Linear DNA 抽出.....	84
2.2.3 酵素処理したプラスミド DNA の非照射細胞への導入と観察.....	85
2.2.4 EGFP 遺伝子の細胞内ゲノムへの導入.....	85
2.3 結果.....	86
2.3.1 不完全な酵素処理による切れ残りプラスミド DNA の検討.....	86
2.3.2 酵素処理プラスミド DNA の形質転換効率.....	87
2.3.3 EGFP 発現細胞のクローニングとプラスミド DNA の細胞内ゲノム導入効率.....	89
2.3.4 予測値の算出と比較.....	94
2.4 考察.....	101
結論.....	105
参考文献.....	108
謝辞.....	112

## 序論

放射線の生物影響に関する研究は、個体レベル、細胞レベル、分子レベルでこれまでに数多く行われてきた。細胞内の核に存在する DNA は生命活動を制御しており、細胞にとって極めて本質的な分子であることから、DNA が放射線に対する最も重要な標的であることが知られている<sup>[1]</sup>。放射線が照射された細胞内の DNA には、一本鎖切断 (Single Strand Break : SSB) や二本鎖切断 (Double Strand Break : DSB)、塩基損傷、脱塩基部位 (Apurinic / Apyrimidinic site : AP サイト)、DNA - タンパク質クロスリンクなどの様々な分子変異 (以下、DNA 損傷) が様々な頻度で誘発される<sup>[2]</sup>。DNA 損傷の大部分は細胞内に備わっている様々な修復経路によって酵素的に速やかに修復される。一方で、修復が困難な難修復性 DNA 損傷は、細胞死や突然変異などの遺伝的な変異や不安定性の原因となることが指摘されている<sup>[3]</sup>。従来行われてきた細胞全体に X 線などの放射線を照射して細胞への放射線影響を調査する研究では、放射線による影響は細胞内の DNA だけでなくミトコンドリアをはじめとした細胞内小器官や細胞膜など多岐にわたる。これらの細胞内小器官への放射線影響が DNA 修復経路にも関与する可能性があることから、放射線による DNA 損傷修復に焦点を当てて修復応答を研究するためには、細胞内小器官の放射線影響を除外する必要がある。放射線を照射した DNA を“非照射の”細胞に導入 (以下、トランスフェクション) することでこの問題を打開することが可能になる。放射線照射 DNA として蛍光タンパク質を発現する遺伝子コードを持つプラスミド DNA を用いることで、細胞内トランスフェクションされた DNA の遺伝子発現を蛍光顕微鏡によって可視化することが可能となる。さらにプラスミド DNA を使用する利点として、放射線による鎖切断を伴う DNA 損傷を生化学的手法により比較的容易に定量すること可能となることが挙げられる。放射線を照射したプラスミド DNA を非照射の細胞に導入し、蛍光タンパク質の EGFP 発現を DNA 修復の程度の指標として観察することで、細胞内における放射線

照射により誘発された DNA 損傷の難修復性の定量化が期待される。

本研究では、放射線の線質及び試料内水分子環境の違いが、生じた DNA 損傷の修復の難易性にどのような違いを与えるかを明らかにすることを目的とした。放射線を照射するプラスミド DNA に緑色蛍光タンパク質 (Enhanced Green Fluorescent Protein : EGFP) 遺伝子をコードする pEGFP-C1 を、DNA をトランスフェクションする細胞としてヒト乳腺組織由来の細胞を用いた。第一章は、異なる水分子環境のプラスミド DNA 試料を用いて、様々な電離放射線を照射し、DNA に生じた鎖切断量を基準とした EGFP 発現を比較することで、試料環境及び線質に依存した DNA 損傷を評価した。さらに同じ組織由来の正常細胞とがん細胞を用いることでプラスミド DNA のトランスフェクション応答を比較した。第二章は、様々な制限酵素を用いて DNA 鎖切断を人為的に導入した“モデル DSB”を作成し、これに対する EGFP 発現細胞率を検討することで DSB サイト依存性を調べた。さらにこれらの結果と第一章で得られた放射線照射プラスミド DNA のトランスフェクション結果を比較するための新たな予測値算出法の開発を目指した。

## 第一章

# 様々な放射線照射により誘発された DNA 損傷と遺伝子発現への影響



## 1.1 背景と目的

放射線の照射によって誘発される DNA 損傷の生成頻度は放射線の線質やそのエネルギーによって異なると考えられている。線エネルギー付与 (Linear Energy Transfer : LET) が比較的低いとされる  $\gamma$  線が哺乳動物細胞へ吸収線量 1 Gy 照射された場合、1 細胞あたりに生じる DNA 損傷は、DSB < DNA-クロスリンク < SSB の順に生成頻度は増加する<sup>[4]</sup>。さらに 8 オキソアデノシン、8 オキソグアニン、ジヒドロチミン及び AP サイト等を全て合計した塩基損傷の生成頻度は SSB の約 3 倍になることが報告されている<sup>[5]</sup>。この DNA 損傷の比率は、 $\alpha$  線などの高 LET 放射線、あるいは低 LET 放射線のトラック末端で生成する二次電子の空間密度に依存して変化することがモンテカルロシミュレーション等により予想されてきたが、その詳細については実験的にはまだ明らかにされていない。

さらに、DNA 損傷がゲノム DNA 上の 1-2 ヘリカルターン (3-7 nm) 程度の局所に多重に生じることで、複雑な DNA 損傷形態 (クラスター損傷) (図 1.1) となることが知られている<sup>[6,7]</sup>。クラスター損傷は、酵素的な修復を受け難く、細胞死や突然変異誘発、さらには遺伝的不安定性を誘発させ<sup>[8]</sup>、結果的にがん化を引き起こす恐れがある<sup>[9]</sup>。数多くのモンテカルロシミュレーション研究により、X 線や  $\gamma$  線のような低 LET 放射線であっても、低速 2 次電子のトラックエンドには高い効率でクラスター損傷が生成することが予測されている<sup>[10,11,12]</sup>。このため放射線の線質に応じた DNA 損傷の生成過程や修復過程を含めた生物学的役割を明らかにすることは、放射線の生体影響の推定やがんの放射線治療の高度化において極めて重要な課題である。



図1.1 クラスタDNA損傷

これまで数多くの生化学的アプローチにより放射線が生じた DNA 損傷について研究がおこなわれてきた。特に 8 オキシグアニンやジヒドロチミンなどの塩基損傷や AP サイトを特異的に認識する塩基除去修復酵素を用いた手法が開発され、放射線照射で生じた塩基損傷や AP サイトの検出が飛躍的に進んだ<sup>[13,14,15]</sup>。原核生物由来のあるいは真核生物由来の塩基除去修復 (BER) 酵素である各種グリコシラーゼ (Endonuclease III (Nth)、Fpg、Endonuclease IV (Nfo)、hNth、hOGG1 など) は、損傷が誘発された塩基を認識しグリコシラーゼ活性により除去する。これにより生じた AP サイトをこれら酵素が持つ AP ライゲース活性により DNA 鎖にニックを入れるため、結果的に放射線により直接誘発した SSB に追加した形で塩基損傷を SSB として検出することが可能となる。また、二つ以上の塩基損傷、SSB あるいは AP サイトが、10 塩基対以内に近接しているクラスタ損傷が生じた場合、酵素処理によりこれらを DSB として検出できる。このような革新的な技術により前述のモンテカルロシミュレーション研究の結果について低 LET 放射線である  $\gamma$  線に関して検証されている<sup>[16,17,18]</sup>。また、クラスタ損傷の修復については、これまでオリゴ DNA 中に人工的に再現されたクラスタ損傷に対する *in vitro* での修復酵素との反応や<sup>[19,20,21]</sup>、これを形質転換した大腸菌の突然変異頻度についての研究<sup>[22,23]</sup>が試みられており、人工合成クラスタ損傷に対する様々な BER 酵素の除去効率が報告されている<sup>[24]</sup>。これらの結果の重要な点として、塩基損傷が BER によって鎖切断に置き換わることでその後の塩基損傷

修復を強く阻害する可能性が示唆されている。前述した BER 酵素を用いたクラスター損傷の検出法では、塩基損傷や AP サイトが数塩基内に局在化している場合は DSB への変換が行われず、その定量したクラスター損傷の収率を過小評価している可能性がある(図 1.2)。また、人工的に合成したが実際の放射線照射においても生成される確証は無く、複雑な損傷形態を BER 酵素によって完全に DSB に変換し定量することが難しいことが指摘されている<sup>[25,26]</sup>。オリゴ DNA 中の合成クラスター損傷を用いて研究されたような修復酵素の活性を阻害するタイプのクラスター損傷が実際に放射線照射によって生じるか否かをどのように検証するのかが大きな問題として残されてきた。一方、DNA 損傷の種類と収率は照射した試料の環境に大きく依存する。高いスクベンジャー環境では DNA 損傷全体の収率は低く抑えられることからバルク水の放射線分解で生じた OH ラジカル等の効果が、個々の損傷生成に大きく寄与していることは明らかである<sup>[5]</sup>。しかしバルク水を排除した水和 DNA 薄膜試料への照射実験から、DNA のごく近傍にある水和水へのエネルギー付与は、鎖切断よりもむしろ塩基損傷の生成に寄与していると指摘されている<sup>[17,27]</sup>。このエネルギー付与を担う要因として、水和水のイオン化による  $H_3O^+$  の生成と、生じた低速の二次電子の解離性付着 (Dissociative Electron Attachment : DEA) である<sup>[28]</sup>。これらによる損傷生成機構は準直接効果 (quasi-direct effect) と分類されるが<sup>[27,28]</sup>、その詳細はまだ十分に解明されてはいない。さらには、これらの損傷を持つ DNA が細胞中でどのように修復を受けるのかについては、これを解明するための実験的なブレイクスルーが必要である。

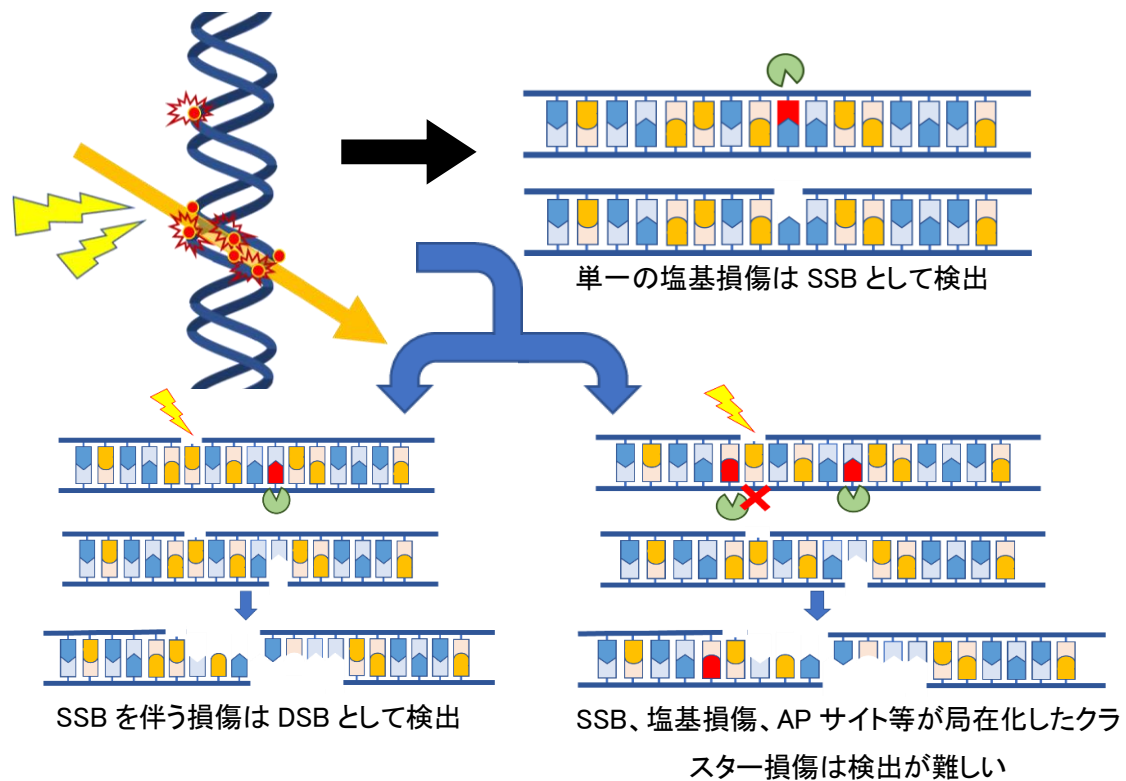


図 1.2 BER 酵素を用いた DNA 損傷の定量化の限界

このような背景から、私は細胞の外部で放射線照射した EGFP 遺伝子をコードするプラスミド DNA 試料を非照射のヒト細胞へトランスフェクションし、細胞内での EGFP 発現の変化から放射線照射により誘発された DNA 損傷の定量を目指すという新しいアッセイ方法を開発した<sup>[29]</sup>。この手法は、DNA 以外の細胞内小器官への放射線影響を除外することで、非照射の細胞による放射線誘発 DNA 損傷の修復反応を評価することを可能とする。蛍光顕微鏡を用いてタイムラプスイメージングにより細胞をライブセル観察し、EGFP 発現細胞数の経時変化を調べ、線量に対する EGFP 発現細胞数の減少を DNA 修復の阻害を示す指標として評価した。この手法を用いて既に、EGFP プラスミド DNA 試料に対する X 線照射によって難修復性 DNA 損傷の生成が示唆された結果を報告した<sup>[30]</sup>。

本研究ではさらに、放射線の線質及び水分子環境に依存した放射線 DNA 損傷の難修復性の解析を目的とした。まず、照射時の試料内水分子の環境に依存した DNA 損傷を評価するために、プラスミド DNA 水溶液 (1×TE) 試料の他に前述したバルク水を排除した水和 DNA 薄膜試料や乾燥 DNA 薄膜試料に対して放射線を照射した。次に、放射線の線質に依存した DNA 鎖切断効果を評価するために、様々な放射線をプラスミド DNA に照射した。実験室線源を用いた硬 X 線の他に、放射光施設を用いてリンの K 殻共鳴ピークである 2.153 keV の単色軟 X 線を照射しリンの K 殻の共鳴光電効果の影響を調べた。さらに、X 線より高 LET 放射線である Ne<sup>10+</sup> イオンビーム (31 KeV/μm) と C<sup>6+</sup> イオンビーム (79 KeV/μm) を照射することで DNA 鎖切断効果の LET 依存性を調べた。線質及び水分子環境の異なるプラスミド DNA 試料をヒト乳腺細胞へトランスフェクションした。この時、DNA 鎖切断効果の異なる放射線の線質及び水分子環境のプラスミド DNA 試料の EGFP 発現細胞率を比較するために、プラスミド DNA にある一定の鎖切断を生じさせる線量を決定した。アガロースゲル電気泳動法により、損傷のない元のプラスミド DNA 画分である Closed Circular form (以下、CC) DNA のバンド強度を定量し、線量に対する CC 量の減少を片対数プロットすることにより、平均 1 ヒットによる DNA 鎖切断を与える D<sub>37</sub> 用量 (以下、1/e 線量) を求めた。この線量を基準にプラスミド DNA に照射することで、異なる線質・異なる試料内水分子条件下におけるトランスフェクション後の EGFP 発現細胞率を相対的に比較することを可能とした。1/e 線量を照射した線質及び水分子環境の異なるプラスミド DNA 試料をトランスフェクションした後、細胞培養が可能な小型インキュベーターを備えた蛍光顕微鏡を用い、プラスミド DNA 由来の EGFP 発現の時間変化をライブセル観察した。EGFP 発現細胞数の培養時間あたりの増加率 (蛍光タンパク質発現速度) の減少を、DNA 修復の障害を示す指標とした。さらに、DNA をトランスフェクションする細胞としての同じヒト乳腺由来のがん細胞である MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7)

及びその正常細胞 MCF-10A (Michigan Cancer Foundation-10A) を使用した。MCF-7 は相同組換え修復 (Homologous Recombination : HR) の重要遺伝子である BRCA1 がヘミ接合性となっている。二つの細胞株を比較することで、放射線により誘発されたプラスミド DNA の DNA 損傷に対して HR 及び BRCA1 の寄与を調べる事が可能となる。また、乳腺がん細胞を用いたトランスフェクション研究の発展は将来的に薬剤などをがん細胞に投与するようながん治療に対して新たな知見を与えると期待される。非照射の MCF-7 および MCF-10A におけるプラスミド DNA のトランスフェクションによる EGFP 遺伝子発現の動態を比較した。これらの実験により得られた結果を元に、放射線により誘発される難修復性 DNA 損傷について議論する。

## 1.2 材料と方法

### 1.2.1 細胞株とプラスミド DNA

#### 1.2.1.1 細胞

外部からプラスミド DNA をトランスフェクションさせる細胞として、本研究では同じ組織由来のがん細胞と正常細胞を比較するために、ヒト乳腺由来のがん細胞である MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7, RIKEN, RCB1904) 及びその正常細胞 MCF-10A (Michigan Cancer Foundation-10A, ATCC, CRL10317) を使用した。MCF-7 は 1970 年に浸潤性乳管がん腫から分離された乳がん細胞株であり<sup>[31]</sup>、MCF-10A は 1984 年に線維嚢胞性乳房組織に由来する乳房上皮細胞株から分離された上皮細胞株である<sup>[32]</sup>。

#### ・ 培養細胞用培地の作成

##### MCF-7 培養培地

500 ml の D-MEM (D-MEM (High Glucose) with L-Glutamine, Phenol Red and Sodium Pyruvate, 043-30085, 和光純薬工業株式会社) にウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum, Qualified, 10270-106, Thermo Fisher SCIENTIFIC) を 55 ml、抗生物質 (Antibiotic-Antimycotic Solution (100 ×), Stabilized, Stabilized, A5955-100ML, SIGMA Life Science) を 5.5 ml 加え、混合したものを MCF-7 細胞培養培地として使用した。

##### MCF-10A 培養培地

500 ml の乳腺上皮細胞培地のキットである MEGM (MEGM, CC-3150, Lonza / Clonetics Corporation) に含まれている基本培地 MEBM (MEGM, CC-3150, Lonza / Clonetics Corporation) に、添加試薬の (MEGM™ SingleQuots™ 添加因子セット, CC-4136, Lonza / Clonetics Corporation) のなかの GA-1000 (CC-4081G, gentamycin-

amphotericin B mix, Lonza / Clonetics Corporation) 以外の4つの試薬 (CC-4009G・CC-4017G・CC-4021G・CC-4031G, Lonza / Clonetics Corporation) を混合したものに、コレラ毒素溶液 (Cholera Toxin Solution, 030-20621, 和光純薬工業株式会社) を終濃度 100 ng/ml 加え、混合したものを MCF-10A 細胞培養培地として使用した。

それぞれの培地は 4 °C で保存し、使用する時はウォーターバス (THERMAX TM-1 A, アズワン株式会社) で 37.0 °C に温めてから使用した。

#### ・ 細胞の解凍と実験の前培養

ディープフリーザー (MDF-DC200V, PHC 株式会社) 内で -80 °C に保存した細胞をウォーターバスで解凍した。15 ml の遠沈管 (15 ml Centrifuge Tube, 430791, CORNING) に細胞懸濁液 1 ml を移し細胞培養培地 9 ml を加え全量を 10 ml にした。遠心分離機 (KUBOTA 5200, 久保田商事株式会社) を使用し、1000rpm で 5 分間遠心した。吸引装置 (ULVAC DAP-15, アルバック機工) を用いて上清を除去した後、培地 1ml を細胞懸濁液に加えピペティングして T25 フラスコ (Tissue Culture Flask, 70 ml, 353082, Canted Neck and Blue Plug Seal Cap (25 cm<sup>2</sup>), Falcon) に移した。T25 フラスコに細胞培養培地を 4 ml 加え、全量を 5 ml にした。T25 フラスコはインキュベーター (COULTER COUNTER Z2, ヤマト科学株式会社) 内で CO<sub>2</sub>濃度を 5%、温度を 37.0 °C で培養し、翌日培地交換を行った。この操作はクリーンベンチ (PCV Clean Bench, HITACHI) 内で行った。

#### ・ MCF-7 の継代と実験の前培養

T25 フラスコに播種した細胞が底面積の 7 割程度まで増殖した時点で継代を行った。インキュベーター (5%CO<sub>2</sub> 37.0 °C 加温条件下) からフラスコを取り出し、吸引装置で培地を吸い出した。PBS 緩衝液 PBS (D-PBS (-), 和光純薬工業株式会社) を加えてフラスコ内を洗浄した。ウォーターバスで 37.0 °C に温めたトリプシン (0.05% Trypsin-



EDTA (1 ×), 25300-054, Thermo Fisher SCIENTIFIC) を 1 ml 加え、インキュベーターに 3 分静置した。フラスコをインキュベーターから取り出し底面を軽く叩き細胞を底面からはがした。培地 4 ml を加え混和した後、細胞懸濁液を 200  $\mu$ l を 9.8 ml のアイソトン溶液 (COULTER ISOTON II DILVENT Z2, 8546719, BECKEMAN COULTER) が入った容器に加え、細胞係数分析装置 (COULTER COUNTER, ヤマト科学株式会社) にて細胞数を 3 回測定した。細胞懸濁液を適当数に希釈し溶液の全量が 5 ml になるように新しいフラスコに播種し、インキュベーター (5%CO<sub>2</sub> 37.0 °C加温条件下) で培養した。

リポフェクション実験の 24 時間前に 96 穴ディッシュ (Tissue Culture Treated by Vacuum Gas Plasma Polystyrene Non-pyrogenic Individually Packaged, 353072, Falcon) に細胞を 1 well あたり  $1.0 \times 10^4$  個/200  $\mu$ l 播種した。この作業は上記の継代方法と同様の操作で細胞の数を測定した。

#### ・ MCF-10A の継代と実験の前培養

MCF-7 と同様に細胞が底面積の 7 割程度まで増殖した時点で継代を行った。インキュベーター (5%CO<sub>2</sub> 37.0 °C加温条件下) からフラスコを取り出し、吸引装置で培地を吸い出し、PBS 緩衝液で洗浄した。トリプシンを加え、フラスコから細胞を底面からはがした。15 ml の遠沈管に細胞懸濁液を移し細胞培養培地を加え全量を 10 ml にした。遠心分離機 (KUBOTA 5200, 久保田商事株式会社) を使用し、1000rpm で 5 分間遠心した。吸引装置を用いて上清を除去した後、培地 5 ml を細胞懸濁液に加え混和した後、以下 MCF-7 と同様に細胞数を測定した後、細胞を播種したフラスコをインキュベーター (5%CO<sub>2</sub> 37.0 °C加温条件下) で培養した。

MCF-7 と同様にリポフェクション実験の 24 時間前に 96 穴ディッシュに細胞を 1 well あたり  $1.0 \times 10^4$  個/200  $\mu$ l 播種した。この作業は上記の継代方法と同様の操作で細胞の数を測定した。

### 1.2.1.3 プラスミド DNA

ヒト細胞にトランスフェクションするプラスミド DNA として pEGFP-C1 を使用した。pEGFP-C1 は、動物培養細胞用クローニング Vector として用いられており、野生型の緑色蛍光タンパク質 GFP を赤方偏移励起に改良し、より明るく蛍光を発色する蛍光タンパク質の EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) を発現する遺伝子をコードしている (図 1.3)。プラスミド DNA は鎖切断によってコンフォメーションが変化することが知られている。インタクトなプラスミド DNA は閉環状 (Closed Circular form) をしているが、SSB が生じると環状 (Open Circular form) に、DSB が生じると直鎖状 (Linear form) に変化する (図 1.4)。このプラスミドは、細菌の選択マーカーとして利用されるネオマイシンとカナマイシンに対する耐性遺伝子を有する。大腸菌に導入した後カナマイシンによる大腸菌のセレクションを行った。大量のプラスミド DNA を大腸菌から抽出・精製するためにキット (QIA filter Plasmid Mega Kit, QIAGEN) を使用した。

本研究は、プラスミド DNA を非照射ヒト細胞内にトランスフェクションし、細胞内のプラスミド DNA 修復応答を、蛍光タンパク質である EGFP を指標に観察した。

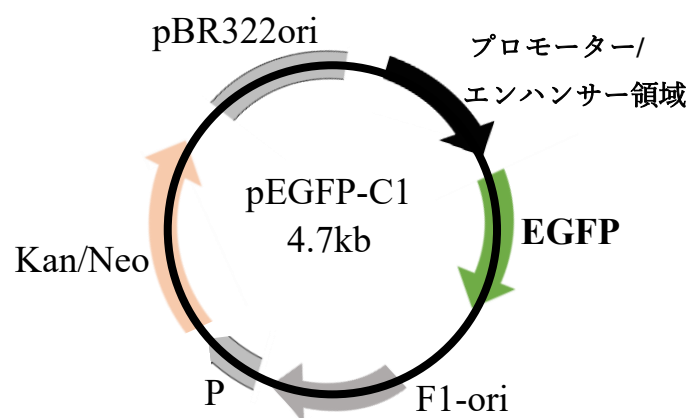


図 1.3 プラスミド DNA (pEGFP-C1)

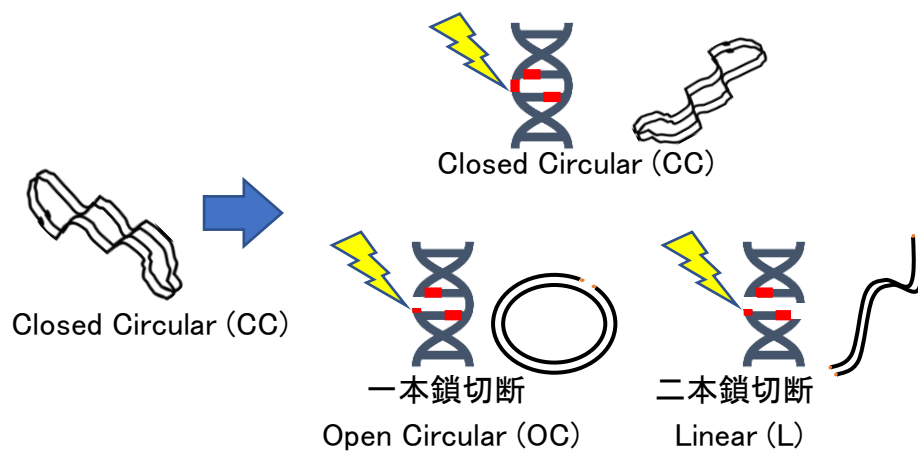


図 1.4 プラスミド DNA のコンフォメーション変化

## ・ 大腸菌用培地の作成

### LB 培地

Millipore 社製 Milli-Q システムによって精製された超純水（水の抵抗値：18.5MΩ）を用いた。超純水を瓶に入れ高圧蒸気滅菌器（HICLAVE HVE-25, HIRAYAMA）により 120 °C、20 分で滅菌した後 4 °C で保存した滅菌水を使用した。LB 粉末（Difco TM LB Broth, Lennox, 240230, Thermo Fisher Scientific）を滅菌水の中に 2% の割合で添加し、高圧蒸気滅菌した LB 培地を作成した。

### LB 寒天培地

LB 粉末を滅菌水の中に 2% の割合で添加した LB 培地 100 ml に対して寒天（Agar, 010-15815, 和光純薬工業株式会社）を 1.5 g 添加し、瓶に入れ高圧蒸気滅菌器により 120 °C、20 分で滅菌した。滅菌終了後クリーンベンチ内にて、LB 培地が冷えて固まらないように素早く、プレート（SCHALE 94/16 L.MG.MN. STERIL, 633183, Greiner Bio-One）4 枚に均等に流し入れた。蓋をせずに 20 分程度室温で冷まし、完全に冷えて固まった後、ラップで覆い 4 °C で保存した。

### SOC 培地

ビーカーまたはフラスコに 100 ml の滅菌水を入れ、3.1 g の 2-YT 培地用粉末（2-YT Broth, 244020, Thermo Fisher Scientific）、0.0186 g の塩化カリウム（Potassium Chloride, 99.9%, 164-13122, 富士フィルム和光純薬工業株式会社）を添加し、スターラーを利用して混和させた。pH メーター（ガラス電極式水素イオン濃度指示計, D-51, 株式会社堀場製作所）を用いて、NaOH 溶液を適量加えることで pH 7.0 に調製した。瓶に移し替えて高圧蒸気滅菌器により 120 °C、20 分で滅菌した。培地が十分冷えてから、1M 塩化マグネシウム 1 ml を無菌的に加え、滅菌した 1M グルコース溶液 2 ml を無菌的に添加し、よく混和させ、4 °C で保存した。

## クロラムフェニコール

クロラムフェニコール (Chloramphenicol, 036-10571, 富士フィルム和光純薬株式会社) を 0.17 g 秤量し、6 ml のエタノール (Ethanol (99.5), 057-00456, 富士フィルム和光純薬株式会社) に溶解させた。アルミホイルで遮光して、使用時まで冷蔵保存した。

### ・ 大腸菌培養

大腸菌株 E.coli HST08 Premium Competent Cells (以降コンピテントセル) にプラスミド DNA<sub>pEGFP-C1</sub> を取り込ませ大量培養してプラスミド DNA の抽出・精製した。コンピテントセルを 100  $\mu$ l (OD 0.6-0.7) を氷上で融解させ、形質転換させるプラスミド DNA (pEGFP-C1) を 100 ng 加え、氷上で 30 分間インキュベートした。42 °C に設定したヒートブロック (CHILLING/HEATING PLATE, FUKAKOSH) で 45 秒間インキュベートした (ヒートショック法)。コンピテントセルを 14 ml 丸底チューブに移し、37°C に温めた SOC 培地を全量 1 ml になるように加えた。培養器 (Bio Shaker V-BR-36, TAITEC) を用いて 37 °C で 1 時間振とう培養した。LB 寒天培地に大腸菌溶液を 50  $\mu$ l、均一に広げた。培養面に結露水などの水分が付着しないように蓋を閉めた寒天プレート逆さまにして、培養器にて 37 °C で 2~3 日程度培養した。白金耳を使ってプレートからひとつのプラークを取り、二段チューブに LB 培地 2 ml とカナマイシン (Kanamycin Sulphate (100 $\times$ ), 15160070, GibcoTM) 100 倍希釈用量を添加した。培養器を用いて 37 °C で 5 時間振とう培養した。分光光度計 (UV-VIS GENESYS 10 シリーズ, Thermo SCIENTIFIC) で濁度 (菌濃度 OD<sub>600</sub>) を測定し、500 ml フィン付きフラスコに LB 培地 250 ml を入れ、一晩振とう培養した。菌液が入った LB 培地 (以下、大腸菌溶液と表記する) 250 ml あたり、クロラムフェニコール 1.5 ml を加え、再度恒温器を用いて 37°C で 6 時間振とう培養した。大腸菌培養液を冷却遠心分離機インバータ・マイクロ冷却遠心機 (KUBOTA 1720, 久保田商事株式会社) で 6000 G、15 分間 4°C で遠心した。上清を捨て、沈殿した大腸菌ペレットのみを残した。

## ・ プラスミド DNA の抽出

キアゲンキット (QIAfilter Plasmid Mega Kit, 12281, QIAGEN) を用いて大腸菌からプラスミド DNA を抽出した。DNA を保存する緩衝液として、0.5 M EDTA を 1 ml と 1M Tris-HCl バッファーを 5 ml 混ぜ、超純水で 500 ml にメスアップし、高圧蒸気滅菌器で滅菌処理した 1×TE バッファーを用いた。pEGFP-C1 を取り込ませた大腸菌のペレットに対してキットの P1 バッファーを 50 ml 注ぎ入れた後懸濁した。P2 バッファーを 50 ml 添加し、室温 (15~25°C) で 5 分間静置した。冷蔵保存した P3 バッファーを 50 ml 添加後、激しく混和した。これを、500 ml 瓶を取り付けた QIA filter Mega Cartridge に注ぎ、室温で 10 分間静置した。その間、QIAGEN tip 2500 に QBT バッファーを 35 ml 注ぎ自然落下させた。QIA filter Mega Cartridge を吸引ポンプで吸引し溶液を滴下させ、さらに Cartridge にバッファーFWB2 を 50 ml 添加し薬さじで攪拌しながら吸引ポンプで溶液を滴下させた。この溶液を QIAGEN tip 2500 に注ぎ自然落下させた後、QC バッファーを 200 ml 添加し自然落下させることでリンスした。QIAGEN tip の下に 50 ml 遠沈管 (ビオラモ遠沈管 VIO シリーズ, アズワン株式会社) を設置して、QF バッファーを 35 ml 添加して DNA を QIAGEN tip のフィルターから溶出させた。溶液に対してイソプロパノール (2-Propanol, 166-04836, 和光純薬工業株式会社) を 0.7 倍量添加して冷却遠心分離機で 4 °C で 15000 rpm、30 分間遠心分離した。上清をデカントし、70% エタノールを 3.5 ml 入れて再び 10 分間遠心分離した。上清をピペットで慎重にデカントした後、ペレット状に残った DNA を乾燥させた。1×TE バッファーを加えて DNA を溶解させ、エッペンチューブ (Safe-Lock tubes 1.5 ml, 0030 120.086, eppendorf) に移し、冷凍庫 (-20°C) で保管した。

## 1.2.2 プラスミド DNA の精製と解析

### 1.2.2.1 エタノール沈殿法による DNA の精製

プラスミド DNA の濃度及び純度を高めるためにエタノール沈殿を行った。プラスミド DNA 溶液に3M 酢酸ナトリウムを DNA 溶液量の 1/10 量添加した。冷やしたエタノール (99.5 %) を DNA 溶液量の 2.5 倍量添加した。よく混和した後、 $-24^{\circ}\text{C}$  で 1 時間から一晩インキュベートした。遠心分離機 (HITACHI CF 15RX II, HITACHI) を用いて  $4^{\circ}\text{C}$  で 15000 rpm、30 分間遠心した。上清を、デカントし冷やした 70%エタノール (エタノール (99.5 %) を滅菌水で薄めて作成) を 100  $\mu\text{l}$  添加した。再び 15000rpm、 $4^{\circ}\text{C}$  で 30 分間遠心し、上清をエッペンドルフのピペットを使用して除去し、DNA のペレットを乾燥させた。任意の量の  $1\times\text{TE}$  Buffer を添加して、DNA のペレットを溶かし DNA 溶液にした後、分光光度計もしくは微量分光光度計にて濃度測定した。リポフェクションに適した濃度  $0.5\ \mu\text{g}/\mu\text{l}\sim 5.0\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$  に調製するため DNA の濃度がこれを下回る場合、再度エタノール沈殿することで DNA 濃度を調整した。

### 1.2.2.2 アガロースゲル電気泳動法と積分強度解析

アガロース (Agarose, A9539-500G, SIGMA Life Science) 2.4 g に対して  $1\times\text{TBE}$  バッファーを 240 ml 加え、アガロースが完全に溶解するまで加熱し  $60^{\circ}\text{C}$  程度まで冷ましてから、型に流し 1%アガロースゲルを作成した。DNA 約 200 ng に Loading バッファー (Gel Loading Dye Purple ( $\times 6$ ), B70245, NEW ENGLAND Bio Labs) を全量の 1/6 量加え、 $1\times\text{TE}$  バッファーで全量 18  $\mu\text{l}$  にメスアップさせ、電気泳動用試料を作成した。作成した試料はボルテックスミキサー (EYELA IMS-1000, 東京理化機器株式会社) で十分に混和させた。 $1\times\text{TBE}$  バッファーで満たされた泳動槽に 1%アガロースゲルを設置し、電気泳動用試料をアプライし、 $5.6^{\circ}\text{C}$ 、40 V で 200 mA、16.7 時間、泳動した。泳動終了後、1L の  $1\times\text{TBE}$  バッファーにエチジウムブロマイド (Ethidium Bromide Solution, 161-043, BIO RAD) を 30  $\mu\text{l}$  添加した溶液に、室温で 30 分間浸透させなが

ら、アガロースゲルを染色した。染色終了後、蛍光標識生体分子解析装置 Ettan DIGE (GE.Health care) でアガロースゲルを蛍光撮影し、DNA バンドの積分強度を解析した。イメージ解析ソフトを用いて、撮影したゲル写真のバンドの蛍光強度を定量した。その際にインタクトなプラスミド DNA である Closed Circular DNA はエチジウムブロマイドがインターカレートされにくいことが知られており、この効果を補正するため Milligan J R et al.の報告<sup>[33]</sup>に従い Closed Circular DNA の蛍光強度を 1.4 倍した値を定量解析に用いた。



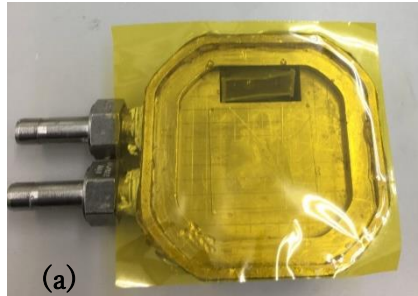
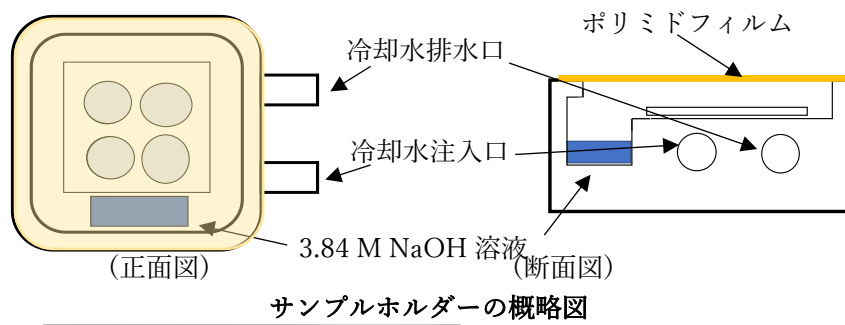
### 1.2.2.3 DNA 試料の濃度測定と照射試料の作製

#### ・DNA 水溶液の濃度測定

DNA 水溶液 (TE buffer 溶液) 2  $\mu\text{l}$  に対して、198  $\mu\text{l}$  の TE buffer を加え、濃度測定用の 100 倍希釈 DNA 溶液を作製した。この DNA 溶液 200  $\mu\text{l}$  と、ブランク用の TE buffer 200  $\mu\text{l}$  を分光光度計用セルに入れ、分光光度計 (GENESYS 10S UV-VIS、Thermo SCIENTIC) にセットし DNA 濃度を 3 回測定した。3 回の測定結果の平均値に対して、希釈率を補正するために 100 倍した値を DNA 濃度とした。

#### ・DNA 水和薄膜の作製

サイズが縦 22mm、横 22mm、厚さ 0.45–0.6mm のガラス基板 (MICROCOVER GLASS 22  $\times$  22 No.5、松浪硝子工業株式会社) に 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  の DNA 水溶液 (1  $\times$  TE buffer 溶液) 各 5  $\mu\text{l}$  を 4 点に滴下した。自然乾燥によって滴下した DNA 水溶液が直径約 5 mm 程度の円形の乾燥膜を形成した後、真空乾燥機 (VD-250F、TAITEC) を用いてさらに 30 分間乾燥した。3.8 M NaOH 溶液を 500  $\mu\text{l}$  をステンレス製のサンプルホルダーにセットしたプラスチック製のセルに入れた。薄膜試料が乗せられたガラス基板を両面テープでサンプルホルダーに固定した。サンプルホルダー全体を厚さ 8  $\mu\text{m}$  のポリミドフィルム (カプトン、東レ・デュポン株式会社) で密閉し、これを 5.6 $^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 97 %、15 時間以上保つことで、DNA の 1 ヌクレオチドあたりに約 35 個の水分子が結合した水和状態にした。作製した薄膜は、目視により均一な透明な膜として観察できた。近縁のごくわずかな部分 (0.1 mm 程度) は光の反射の様子から僅かに隆起しているように見えたが、X 線の試料透過率から計算される吸収線量に影響を与えないと判断した。サンプルホルダーの概略図及び写真を、図 1.5 に示す。



サンプルホルダー及びガラス基板の写真

図 1.5 サンプルホルダーの概略図及び写真

(a) はサンプルホルダーの正面図、(b) はサンプルホルダーの側面図 (ポリミドフィルムを被せていない状態) の写真を示す。

#### ・DNA 乾燥薄膜の作製

水和 DNA 薄膜作製と同様に、ガラス基板に  $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  の DNA 水溶液 (TE buffer 溶液) 各  $5 \mu\text{l}$  を 4 点に滴下した。DNA 水溶液が薄膜状になるまで自然乾燥し、さらに真空乾燥機を用いて 30 分間乾燥した。ガラス基板をサンプルホルダーに固定し、厚さ  $8 \mu\text{m}$  のポリミドフィルムで密閉し、乾燥 DNA 薄膜を作製した。水和 DNA 薄膜同様に作製した薄膜は、目視により均一な膜として観察できた。近縁のごくわずかな部分 ( $0.1 \text{ mm}$  程度) は僅かに隆起しているように見えたが、上記の理由から本試料についても辺縁部の厚みの違いは吸収線量に影響を与えないと判断した。図 1.6 にプラスミド DNA 薄膜の写真を示す。

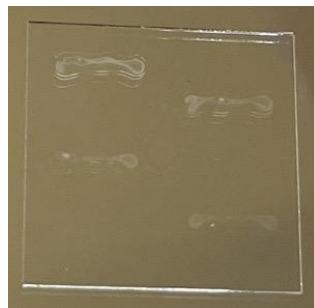


図 1.6 ガラス基板上に作製したプラスミド DNA 薄膜の写真

### 1.2.3 プラスミド DNA への放射線照射

プラスミド DNA に対して放射線がもたらす DNA 損傷が EGFP 発現にどのような影響を与えるのかを調べるために、トラックの直接作用の効率を相対的に増やした上でその効果を評価するため、研究室（東海）の実験室線源である 150 kVp X 線発生装置を用いて X 線（以下、硬 X 線）照射と、高エネルギー加速器研究機構フotonファクトリー施設のビームライン 27B を使用してリン K 殻共鳴励起エネルギー近傍の単色軟 X 線（以下、軟 X 線）照射を行った。さらに LET の変化が DNA 損傷およびその修復に関与するのかを比較するために、量子科学技術研究開発機構・量子医科学研究所の重粒子線がん治療装置（HIMAC）を使用して  $^{20}\text{Ne}^{10+}$  ビーム照射と、 $\text{C}^{6+}$  ビーム照射を行った。

#### 1.2.3.1 プラスミド DNA に対する硬 X 線照射

X 線発生装置のターゲットはタングステン（特性 X 線は約 70 Kev）を用いて、プラスミド DNA に対する X 線照射を行った。装置のターゲットはタングステンであり、特性 X 線のエネルギーは 60~70 keV である。X 線発生装置のエージングを行った後、線発生装置内の土台となる台座を設置し、線量率を上げるためにジャッキを二つ重ね照射口と DNA 試料の距離をできるだけ小さくした。水溶液プラスミド DNA への照射は、氷水を入れたエッペンチューブケースに、プラスミド DNA 水溶液（1×TE）を入れたエッペンチューブを設置して照射した。すべての DNA 試料の照射が終了するまで、他の DNA 試料は発泡スチロール容器に氷を入れたものに保存し、照射完了後は DNA 試料を冷蔵庫（-20 °C）で保管した。水和及び乾燥薄膜プラスミド DNA への照射は、冷却水循環装置（RE104、LAUDA）を用いて、照射時のサンプルホルダーの温度を 5.6°C に保ちながら行った。照射後、DNA 試料を 10  $\mu\text{l}$  の TE buffer に溶解し、回収した溶液を 20  $\mu\text{l}$  エッペンチューブに入れ冷蔵庫（-20 °C）で保管した。

X 線発生装置は電圧 150 kVp、管電流 6.0 mA、線量率 15.589 Gy/min で運転した。

この時、ビーム出射口に設置されている 0.5 mm のアルミニウム板フィルターにより 10 keV 以下の低エネルギー X 線が遮蔽されることで、比較的高エネルギーの X 線が照射される。水溶液の DNA 試料では、吸収線量が 0.2 kGy、0.4 kGy、0.6 kGy、0.8 kGy、1.0 kGy、1.2 kGy となるように照射した。水溶液プラスミド DNA への X 線照射の簡略図を図 1.7 に示した。水和及び乾燥薄膜の DNA 試料では、吸収線量が最大 4.0 kGy となるように照射した。

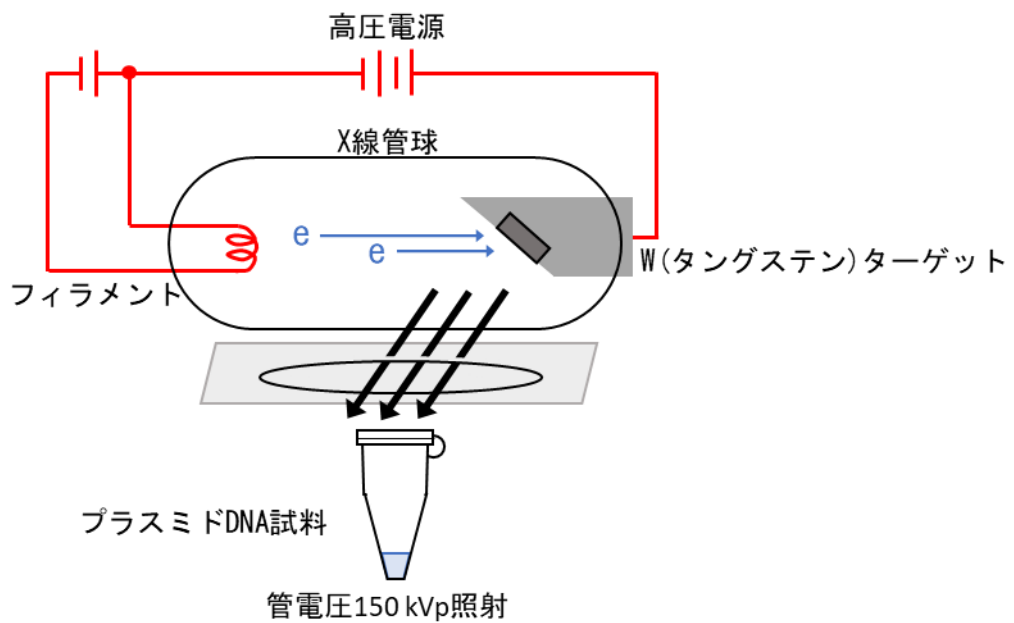


図 1.7 水溶液プラスミド DNA への X 線照射時の簡略図

### 1.2.3.2 プラスミド DNA に対する軟 X 線照射

高エネルギー加速器研究機構フotonファクトリー放射光実験施設のビームライン 27B の軟 X 線照射装置を用いて、リンの K 殻共鳴ピークである 2.153 keV とその前後の 2.147 keV 及び 2.160 keV の単色軟 X 線をプラスミド DNA へ照射した。軟 X 線は透過率が非常に小さくエッペンチューブの容器で容易に遮蔽されるため、ガラス板にプラスミド DNA 溶液の乾燥薄膜を作成し、これに軟 X 線を照射した (図 1.8)。小型の自由空気電離箱 (以下、イオンチャンバー) によって求められる電流値から線量率を計算し、目的の線量を照射した。イオンチャンバーの簡略図を図 1.9 に示す。DNA 溶液 (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 1  $\times$  TE buffer 溶液) を保冷剤入りの発泡スチロール容器の中に入れてフotonファクトリーの放射性試料用 X 線実験ステーションまで運搬した。プラスミド DNA 水溶液を 4.5 倍希釈し (0.222  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 1  $\times$  TE buffer 溶液)、ガラス基板 (MICROCOVER GLASS 22  $\times$  22 No.5, 松浪硝子工業株式会社) 1 枚あたりに 2.5  $\mu\text{l}$  ずつ滴下し、自然乾燥させることで横幅 7mm  $\times$  縦幅 2mm の DNA 乾燥薄膜を 4 点作成した。ガラス板中央位置からの DNA 乾燥薄膜の距離を測定し、測定値分サンプル台を移動させることで DNA 乾燥薄膜へ軟 X 線を照射した。照射完了後、DNA 乾燥薄膜を 1  $\times$  TE バッファーで回収し、研究室まで運搬した。これ以降の実験を行うまでの間、DNA 試料を冷蔵庫 (-20  $^{\circ}\text{C}$ ) で保管した。このプラスミド DNA 薄膜試料に対する軟 X 線の透過率および吸収線量の計算方法は、次項に後述した。

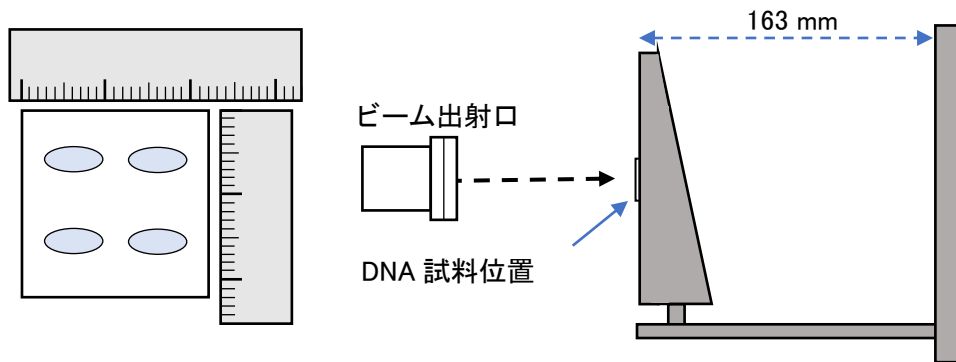


図 1.8 軟 X 線照射の簡略図

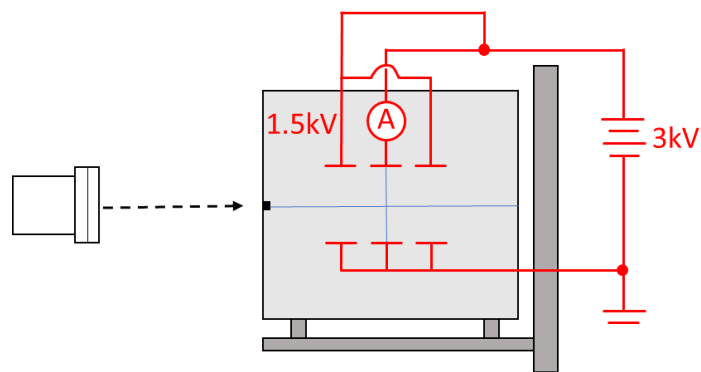


図 1.9 イオンチャンバーの簡略図

## ・透過率の計算

2.147 keV、2.153 keV、2.160 keV におけるプラスミド DNA と TE buffer を構成する元素の原子 1 つあたりの質量エネルギー吸収係数 ( $\mu_{en}/\rho$ ) をローレンス・バークレー国立研究所の X 線と物質との相互作用に関するデータベース, CXRO の X-ray properties of the elements から調べた。これを表 1.1 に示す。また、1 ヌクレオチド対と TE buffer の原子組成の値を表 1.2 に示す。

表 1.1 2.147 keV、2.153 keV、2.160 keV の原子 1 つあたりの質量エネルギー吸収係数 ( $\mu_{en}/\rho$ )<sub>i</sub> (m<sup>2</sup>/kg)

1 ヌクレオチド対の構成元素	2.147 keV	2.153 keV	2.160 keV
H	0.05	0.05	0.05
C	24.5	24.3	24.1
N	38.6	38.2	37.9
O	57.4	56.9	56.4
P	267.0	265.2	263.1
Cl	37.2	36.9	36.6
Na	127.6	126.7	125.6

表 1.2 1 ヌクレオチド対と TE buffer の原子組成 (Atomic Composition: Ai) [7,25]

1 ヌクレオチド対の構成元素	原子組成	TE buffer の構成元素	原子組成
H	22.57	H	13.2
C	19.57	C	5
N	7.42	N	1.2
O	13.42	O	3.8
P	2	Cl	0.56
Na	2	Na	0.3

リン K 殻吸収端近傍におけるプラスミド DNA 分子の吸収スペクトルと吸光度の比率をそれぞれ図 1.10 と表 1.3 に示す<sup>[34]</sup>。プラスミド DNA の構造をとると吸収端は複雑になり、リン K 殻共鳴吸収ピークのエネルギーの前後で、吸光度が異なるため、リン



原子の質量エネルギー吸収係数を補正する必要がある。本研究では、表 1.3 に記載されている 2.159 keV の吸光度の比率の値を、2.160 keV の吸収線量の計算に用いた。まず、表 1.1 と表 1.2 より軟 X 線を照射した時のプラスミド DNA を構成する元素の原子 1 つあたりの質量エネルギー吸収係数の値に、対応する原子の 1 ヌクレオチドあたりの原子組成の値を乗じて合計し、プラスミド DNA を構成する元素全ての 1 ヌクレオチドあたりの質量エネルギー吸収係数の和を算出した。算出した値を表 1.4 に示す。

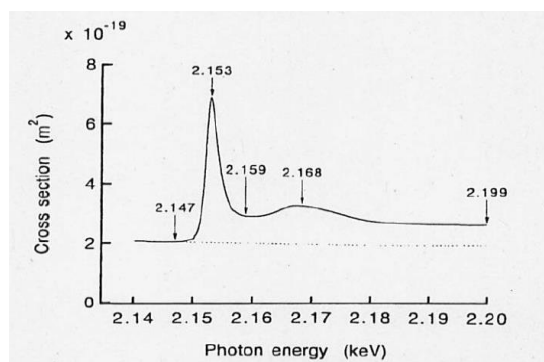


図 1.10 リン K 殻吸収端近傍におけるプラスミド DNA 分子の吸収スペクトル<sup>[34]</sup>

表 1.3 リン K 殻吸収端近傍におけるプラスミド DNA 分子の吸光度の比率<sup>[34]</sup>

エネルギー (keV)	プラスミド DNA 分子の吸光度の比率
2.147	1.00
2.153	3.36
2.159	1.43

\* 2.147 keV を 1.00 に規格化した。

表 1.4 プラスミド DNA を構成する元素の 1 ヌクレオチドあたりの質量エネルギー吸収係数の和

エネルギー (keV)	質量エネルギー吸収係数 ( $\mu_{en}/\rho$ ) ( $m^2/kg$ )
2.147	2327
2.153	7817
2.160	3327

表 1.4 の値から算出した値を引き、表 1.2 の 1 ヌクレオチド対のリン原子の原子組成の値で除した。これにより、リンの原子 1 つあたりの質量エネルギー吸収係数の値を補正した。補正した後の値を表 1.5 に示す。

表 1.5 補正後(オレンジ色の部分)の 2.147 keV、2.153 keV、2.160 keV のプラスミド DNA の構成元素の原子 1 つあたりの質量エネルギー吸収係数( $\mu_{en}/\rho$ )<sub>i</sub>(m<sup>2</sup>/kg)

	2.147 keV	2.153 keV	2.160 keV
H	0.05	0.05	0.05
C	24.5	24.3	24.1
N	38.6	38.2	37.9
O	57.4	56.9	56.4
P	267.0	3020.0	782.4
Na	127.6	126.7	125.6

次に、1 ヌクレオチド対と TE buffer の分子量を求めた。1 ヌクレオチド対と TE buffer を構成する各々の元素(i)の原子量( $n_i$ )に、原子組成( $A_i$ )の値を乗じて合計したものを表 1.6 に示す。

表 1.6 1 ヌクレオチド対と TE buffer の分子量

1 ヌクレオチド対の構成元素	1 ヌクレオチド対の分子量( $n_i \times A_i$ )	TE buffer の構成元素	TE buffer の分子量( $n_i \times A_i$ )
H	22.75	H	13.31
C	235.06	C	60.06
N	103.93	N	16.81
O	214.71	O	60.80
P	61.95	Cl	19.85
Na	45.98	Na	6.897
合計	684.37	合計	177.72

表 1.5 と表 1.6 のデータを用いて、プラスミド DNA と TE buffer のそれぞれの質量エネルギー吸収係数を式 (1) より求めた。算出した値を表 1.7 に示す。

$$(\mu_{en}/\rho) = \frac{\sum_i (\mu_{en}/\rho)_i \times n_i \times A_i}{\sum_i n_i \times A_i} \dots (1)$$

表 1.7 プラスミド DNA と TE buffer を構成する元素の質量エネルギー吸収係数

	2.147 keV	2.153 keV	2.160 keV
DNA	65.0	313.9	111.0
TE buffer	40.7	40.3	40.0

表 1.7 より、プラスミド DNA 薄膜試料の質量エネルギー吸収係数を式 (2) より求めた。

$$(\mu_{en}/\rho)_{sample} = (\mu_{en}/\rho)_{DNA} \times f_{DNA} + (\mu_{en}/\rho)_{TE\ buffer} \times f_{TE\ buffer} \dots (2)$$

$f_{DNA}$  と  $f_{TE\ buffer}$  はそれぞれプラスミド DNA と TE buffer の質量分率の値である。プラスミド DNA と TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA) の質量分率の値を求めるために、プラスミド DNA 薄膜 1 カ所あたりのそれぞれの質量を算出した。Tris-HCl のモル質量は 157.60 g/mol、EDTA のモル質量は 292.24 g/mol である。

$$\text{プラスミド DNA: } 0.22 \mu\text{g}/\mu\text{L} \times 0.25 \mu\text{L} = 0.55 \mu\text{g} = 5.50 \times 10^{-10} \text{ kg}$$

$$\begin{aligned} \text{10 mM Tris: } & (2.5 \times 10^{-6} \text{ L}) \times (10 \times 10^{-3} \text{ mol/L}) = 2.5 \times 10^{-8} \text{ mol} \\ & (2.5 \times 10^{-8} \text{ mol}) \times (157.60 \text{ g/mol}) = 3.94 \times 10^{-9} \text{ kg} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{1 mM EDTA: } & (2.5 \times 10^{-6} \text{ L}) \times (1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}) = 2.5 \times 10^{-9} \text{ mol} \\ & (2.5 \times 10^{-9} \text{ mol}) \times (292.24 \text{ g/mol}) = 7.31 \times 10^{-10} \text{ kg} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{プラスミド DNA + TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA): } & 5.5 \times 10^{-10} \text{ kg} + 4.67 \times 10^{-9} \text{ kg} \\ & = 5.22 \times 10^{-9} \text{ kg} \end{aligned}$$

上記より、プラスミド DNA と TE buffer の質量分率の値 ( $f_{DNA}$ ,  $f_{TE\ buffer}$ ) を算出した。

$$f_{DNA}: (5.50 \times 10^{-10}) / (5.22 \times 10^{-9}) = 0.105$$

$$f_{TE\ buffer}: (4.67 \times 10^{-9}) / (5.22 \times 10^{-9}) = 0.895$$

式(2)に  $f_{DNA}$  と  $f_{TE\ buffer}$  の値を入れてプラスミド DNA 薄膜試料の質量エネルギー吸収係数を算出した。プラスミド DNA 試料の質量エネルギー吸収係数 ( $\mu_{en}/\rho$ ) ( $m^2/kg$ ) は 2.147 keV では 43.2、2.153 keV は 69.2、2.160 keV は 47.5 である。

次にプラスミド DNA 薄膜試料の透過率を求めた。入射する X 線の強度を  $I_0$  とし、透過した X 線の強度を  $I$  とすると、Lambert-Beer の法則である以下の式 (3) と表す。

$$I = I_0 e^{-\varepsilon c l} \dots (3)$$

この式において、 $\varepsilon$  はモル吸光係数、 $c$  は溶液のモル濃度 (mol/L)、 $l$  は光路長である。また、この式は質量エネルギー吸収係数を使って、以下の式 (4) と表す。

$$I = I_0 e^{-\left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)\rho x} \dots (4)$$

この式において、 $\rho$  は密度 ( $kg/m^3$ )、 $x$  は厚み (m) である。本研究では、 $\rho$  ( $kg/m^3$ ) と  $x$  (m) を乗じて、面密度 ( $kg/m^2$ ) を算出して透過率の計算に用いた。面密度は DNA 薄膜 1 ヶ所あたりの質量 (kg) を面積 ( $m^2$ ) で除することで算出した。式 (4) を変形し、透過率 ( $I/I_0$ ) を式 (5) より求めた。算出したエネルギーごとの透過率を表 1.8 に示す。

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)\rho x} \dots (5)$$

表 1.8 エネルギーごとの透過率

	2.147 keV	2.153 keV	2.160 keV
質量エネルギー吸収係数 ( $\mu_{en}/\rho$ ) ( $m^2/kg$ )	43.2	69.2	47.5
プラスミド DNA 薄膜 1 ヶ所あたりの質量 (kg)	$5.22 \times 10^{-9}$	$5.22 \times 10^{-9}$	$5.22 \times 10^{-9}$
プラスミド DNA 薄膜 1 ヶ所あたりの面積 ( $m^2$ )	$1.50 \times 10^{-5}$	$1.50 \times 10^{-5}$	$1.50 \times 10^{-5}$
面密度 ( $kg/m^2$ )	$3.48 \times 10^{-4}$	$3.48 \times 10^{-4}$	$3.48 \times 10^{-4}$
透過率 $I/I_0$	0.9851	0.9762	0.9836

## ・吸収線量の計算

シンクロトロンリングの蓄積電流値 (nA) と照射量率 (R/s) の値は、イオンチャンバーに出力された。初回の実験時にイオンチャンバーに出力された蓄積電流値が 3.8 nA、照射量率は 37.5 R/s であり、電流値から照射量率へ換算するための値は  $37.5/3.8=9.87$  と決定した。まず、電離箱の中心位置での正しい照射量率を算出した。照射量は空気の質量当たりの電荷で決定されるため、電離体積内の空気の質量を正しく決める必要がある。標準状態 (0°C、1 気圧=760 mmHg) の空気密度を  $\rho_0$ 、計測時 (摂氏  $t^\circ\text{C}$ 、H mmHg) の密度を  $\rho$  とすると補正係数  $d_c$  は式 (6) より求めた。

$$d_c = \frac{\rho}{\rho_0} = \frac{1}{1+0.00367t} \times \frac{H}{760} \dots (6)$$

$\rho_0$  の値は  $0.001293 \text{ g/cm}^3$ 、0.00367 は空気の膨張係数である。計測時の温度は  $20.0^\circ\text{C}$ 、水銀マンメーターの値は  $750.0 \text{ mmHg}$  であり、 $d_c$  の値を 0.919 と算出した。次に、イオンチャンバーの集電極の長さが 30 mm あるために平均値と電極の中央位置での値が異なるため補正した。X 線強度が減衰し  $1/e$  になる距離を減衰距離 (MFP) を式 (7) より求めた。また、電極の長さによる補正係数  $f_c$  を式 (8) より求めた。それぞれのエネルギーでの空気の質量エネルギー吸収係数、MFP、 $f_c$  の値を表 1.9 に示す。電離箱の出力が  $E(\text{R/s})$  だった時の正しい値  $E_0$  を式 (9) より求めた。

$$\text{MFP} = 1000 / (\mu_{\text{en}} / \rho)_{\text{air}} / 1.293 \dots (7)$$

$$f_c = \frac{\exp(-\frac{15}{\text{MFP}})}{\frac{1}{30} \int_0^{30} \exp(-\frac{x}{\text{MFP}}) dx} = \frac{\exp(-\frac{15}{\text{MFP}})}{\frac{\text{MFP}}{30} \{1 - \exp(-\frac{30}{\text{MFP}})\}} \dots (8)$$

表 1.9 空気の質量エネルギー吸収係数  $(\mu_{en}/\rho)_{air}$  (m<sup>2</sup>/kg)、MFP、 $f_c$  値

	2.147 keV	2.153 keV	2.160 keV
空気の質量エネルギー吸収係数 $(\mu_{en}/\rho)_{air}$ (m <sup>2</sup> /kg)	40.86	40.53	40.16
MFP (mm)	18.93	19.08	19.26
$f_c$	0.9025	0.9040	0.9056

$$E_0(R/s) = E(R/s) \times \frac{1}{d_c} \times f_c \cdots (9)$$

次に、DNA 試料表面からイオンチャンバー中心までの空気層による減衰を考慮する。空気層の厚さは 72.9 mm であり、補正係数  $f_{AA}$  は、表 1.9 と式 (10) より求めた。その結果、補正係数  $f_{AA}$  は 2.147 keV は 47.04、2.153 keV は 45.64、2.160 keV は 44.04 となった。

$$f_{AA} = \exp\left(\frac{72.9}{MFP}\right) \cdots (10)$$

イオンチャンバー中心では DNA 試料表面での値から補正係数  $f_{AA}$  の値を除いた数値が出力されているため、イオンチャンバーに出力された照射量率 (R/s) から DNA 試料への吸収線量率 (Gy/s) へ換算するには、補正係数  $f_{AA}$  を乗じる必要がある。DNA 試料表面の照射量率 (R/s) を  $E_s$  と定義すると、 $E_s$  を式 (11) より求めた。

$$E_s = E_0 \times f_{AA} \cdots (11)$$

次に、DNA 試料表面でのエネルギーフルエンス率 (J/m<sup>2</sup>/s) を決定した。表 1.9 を用いて照射量率  $E_s$ (R/s) からエネルギーフルエンス率  $F$  (J/m<sup>2</sup>/s) を式 (12) より求めた。

$$F(J/m^2/s) = E_s(R/s) \times 0.000258 \times \frac{W}{(\frac{\mu_{en}}{\rho})_{air}} \cdots (12)$$

この式における 0.000258 は(R)から(C/kg)への換算係数{(C/kg)/R}、W は乾燥空气中で 1 イオン対を作るのに必要なエネルギーで 33.73 J/C である。吸収線量率を D (Gy/s) として式 (13) より求めた。

$$D(\text{Gy/s}) = \frac{S_{\text{sample}}}{M_{\text{sample}}} \times 0.000258 \times \frac{W}{\left(\frac{\mu_{\text{en}}}{\rho}\right)_{\text{air}}} \times f_{AA} \times \frac{1}{d_c} \times f_c \times E(\text{R/s}) \cdots (13)$$

この式における  $S_{\text{sample}}$  は DNA 薄膜試料の面積 ( $\text{m}^2$ )、 $M_{\text{sample}}$  は DNA 薄膜試料の質量 (kg) である。式 (13) の照射量率  $E(\text{R/s})$  以外を乗じて算出した値を A と定義する。A の値を表 1.10 に示す。

表 1.10 式(13)の照射量率 E(R/s)以外を乗じた値

	2.147 keV	2.153 keV	2.160 keV
A	28.27	27.69	27.02

プラスミド DNA 薄膜試料に吸収される線量は  $D \times (1 - \text{透過率})$  (Gy/s) である。DNA 試料に吸収された線量  $D_s$  (kGy) を式 (14) より求めた。

$$D_s(\text{kGy}) = \frac{(9.87 \times A \times B \times C \times D)}{1000} \cdots (14)$$

この式における数値 9.87 は蓄積電流値 (nA) から照射量率 E (R/s) へ変換するための値、B はシンクロトロンリングの蓄積電流値 (nA)、C は照射時間 (s)、D は (1-透過率) である。透過率を示した表 1.8 と式 (14) から、 $\{(9.87 \times A \times D)/1000\}$  の値を算出した。算出した値を表 1.11 に示す。この値を F と定義する。F に B と C を乗じることによって、それぞれのエネルギーごとのプラスミド DNA 薄膜試料の吸収線量 (kGy) を算出した。

表 1.11 式(14)の $\{(9.87 \times A \times D)/1000\}$ の値

	2.147 keV	2.153 keV	2.160 keV
F	$4.17 \times 10^{-3}$	$6.50 \times 10^{-3}$	$4.37 \times 10^{-3}$

### 1.2.3.3 Ne 線照射

$^{20}\text{Ne}^{10+}$  ビーム（以下、Ne 線）の照射は、量子科学技術研究開発機構・量子医科学研究所の重粒子線がん治療装置（HIMAC）で行った。Ne 線のイオン粒子あたりのエネルギーは 400 MeV/u、線量率は約 140 Gy/min、入射された試料での LET31 keV/ $\mu\text{m}$  とした（純水と仮定して試料容器であるポリプロピレンチューブの壁の厚みによる減衰を考慮）。試料位置でのビームサイズは直径 30 mm  $\phi$  程度に収束したビームを照射した。ビーム位置調整及び所定の線量でのビームの出射・終了など、ビーム施設の運転は規定に沿い、HIMAC の技術スタッフが行った。DNA 試料は X 線照射 DNA 試料と同様に研究室（東海）の実験室で作成した DNA 溶液（1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 1  $\times$  TE buffer 溶液）を、保冷剤入りの発泡スチロール容器の中に入れて重粒子線棟の生物照射室まで運搬した。DNA 試料を入れた 0.5 ml ポリプロピレン製 Tube を 3 本照射用アクリル板にセットして室温（25.1 $^{\circ}\text{C}$ ）で照射した。設定した線量（0.5, 1.5, 2.0 kGy）を照射し終えたタイミングで試料を 1 本ずつ取り出すような累積照射を行った（計画線量 500:  $2.207390 \times 10^{-3}\text{Gy}/\text{count}$ 、計画線量 1000:  $2.207468 \times 10^{-3}\text{Gy}/\text{count}$ 、計画線量 500:  $2.207256 \times 10^{-3}\text{Gy}/\text{count}$ ）。3 本の照射試料のそれぞれの吸収線量は 504、1505、2006Gy である。照射用アクリル板に低温恒温水槽 LTB-250 から冷水を循環させて、照射中の DNA 試料の温度を 5.6 $^{\circ}\text{C}$  に保った。すべての試料の照射が終了するまで、他の DNA 試料は室温で保存し、照射終了と同時に保冷剤入りの発泡スチロール容器の中に入れた。照射完了後、DNA 試料を研究室まで運搬し、これ以降の実験を行うまでの間、照射試料を冷蔵庫（-20  $^{\circ}\text{C}$ ）で保管した。



#### 1.2.3.4 C線照射

C<sup>6+</sup>ビーム(以下、C線)の照射は量子科学技術研究開発機構・量子医科学研究所の重粒子線がん治療装置(HIMAC)で3回行った。1回目と2回目でDNAのサブバイバル照射を行い、Closed Circular DNAの残存率から生存率曲線を求め、D37線量を決定し、3回目の実験でDNA溶液にD37線量を照射した。C線のイオン粒子あたりのエネルギーは290 MeV/u、線量率は200 Gy/min、入射された試料でのLETを76.9 keV/μmとした(純水と仮定して試料容器であるポリプロピレンチューブの壁の厚みによる減衰を考慮)。試料位置でのビームサイズは直径30 mm φ程度に収束したビームを照射した。ビーム位置調整及び所定の線量でのビームの出射・終了など、ビーム施設の運転は規定に沿い、HIMACの技術スタッフが行った。DNA試料はNe線と同様にDNA溶液(1 μg/μl, 1×TE buffer溶液)を保冷剤入りの発泡スチロール容器に入れて運搬した。生物照射室でDNA溶液中のトリスバッファーのモル濃度を10mMと208mMの2種類のDNA溶液を作成し、放射線スクャベンジ効果を調べた。3本のDNA溶液20 μl入りの0.5 mlポリプロピレン製チューブを照射用アクリル板にセットして室温(25.5°C)で照射した。照射時のアクリル板製の照射ホルダーの写真を図1.11に示す。

設定した線量(0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 kGy)を照射し、1.2 kGy DNA試料は0.2 kGyと1.0 kGyの累積照射を行った(計画線量 200:  $1.600793 \times 10^{-3}$  Gy/count、計画線量 400:  $1.601758 \times 10^{-3}$  Gy/count、計画線量 600:  $1.612197 \times 10^{-3}$  Gy/count、計画線量 800:  $1.601978 \times 10^{-3}$  Gy/count、計画線量 1000:  $1.600947 \times 10^{-3}$  Gy/count)。すべてのDNA試料の照射が終了するまで、他の試料は室温で保存し、照射終了と同時に保冷剤入りの発泡スチロール容器の中に入れた。照射完了後、DNA試料を研究室まで運搬し、これ以降の実験を行うまでの間、照射試料を冷蔵庫(-20 °C)で保管した。

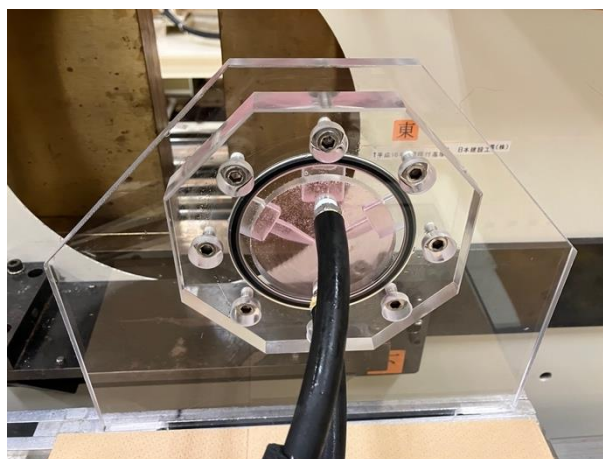


図 1.11 アクリル板製の照射ホルダー

3本のポリプロピレン製チューブ内の試料溶液部をビームサイズ 30 mm $\phi$  に収まるように、中心に 60° の角度で配置した。全ての試料にビームが同時に均等に照射された。黒いホースは冷却水の配管であり、冷媒（ピンク色の溶液）を循環させた。

#### 1.2.4 トランスフェクション

Thermo Fisher Scientific 社の Lipofectamine を用いたリポフェクション法によりプラスミド DNA を細胞にトランスフェクションした。96well ディッシュの 1well あたり  $1 \times 10^4$  個/200  $\mu\text{l}$  の細胞を、トランスフェクションの 24 時間前に播種した。この操作は、細胞の前培養（材料と方法 1.2.1）と同様の手法で行った。96well ディッシュに 1well あたり Opti-MEM (Opti-MEM® Reduced Serum Media, 31985-062, Thermo Fisher Scientific,) 5  $\mu\text{l}$  に Lipofectamine (Lipofectamine® 3000 Reagent, L3000-001, Thermo Fisher Scientific) を 0.3  $\mu\text{l}$  添加した溶液 A を作成した。これとは別に Opti-MEM を 5  $\mu\text{l}/\text{well}$ 、p3000 (Lipofectamine® 3000 Reagent, L3000-001, Thermo Fisher Scientific) を 0.4  $\mu\text{l}/\text{well}$ 、DNA 溶液を 0.2 $\mu\text{g}/\text{well}$  を混ぜ合わせた溶液 B を作成した。溶液 B に溶液 A を添加することでリポフェクション溶液を作成した。リポフェクション溶液を室温で 15 分間インキュベートした後、96well ディッシュの細胞に滴下した。

#### 1.2.5 タイムラプス撮影

##### 1.2.5.1 小型培養器付きの CO<sub>2</sub> チャンバーのセット操作

タイムラプス撮影の 1 時間程度前から温度を安定させるために暖機運転した。蛍光顕微鏡内に小型培養器付きのチャンバーホルダを設置した。シリンジ等を用いて水槽に滅菌水を入れた。CO<sub>2</sub>チャンバーコントローラの電源及び MIX GAS POWER のスイッチを入れ、CO<sub>2</sub>ガスボンベの元栓を開けてガスが出ていることを確認した。コントローラのトップヒーター及びバスヒーターを 37.0°C、CO<sub>2</sub>濃度を 5.0 に設定した。

##### 1.2.5.2 BZ-X Viewer ソフトを用いたタイムラプス設定

オールインワン蛍光顕微鏡内 (BZ-710, KEYENCE) にディッシュを設置した培養用 CO<sub>2</sub>チャンバー (INC (Incubation System for Microscopes), TOKAI HIT 社) を入れ、CO<sub>2</sub>濃度を 5.0%、温度 37 °C に保持しライブセルの状態ディッシュ内の細胞を観察

した。使用した蛍光フィルターBZ-X GFP OP-87763 (KEYENCE) 励起波長:470/40、吸収波長 525/50、ダイロミックミラー波長:495 である。撮影アプリケーション BZ-X Viewer (KEYENCE) のタイムラプス撮影機能を使用した。撮影条件は、マルチカラーを選択し、励起光強度を 100%へ変更した後、明視野撮影から位相差の撮影へ変更した。三次元的に解析することが可能になる「Z スタック」機能および、複数の地点の撮影が可能となる「多点」機能、を選択し、ポイントごとに個別の設定で撮影した。レンズの露光の設定は以下の条件で1時間毎に48時間撮影した。

- ・4倍レンズの場合、明視野で露光:1/700 sec、Green:1/5s、ピッチ幅 14.9  $\mu\text{m}$
- ・20倍レンズの場合、明視野で露光:1/150 sec、Green:1/20s、ピッチ幅 4  $\mu\text{m}$

### 1.2.6 蛍光顕微鏡撮影写真の解析

タイムラプス撮影した写真は解析ソフト「BZ-X Analyzer」で解析した(図 1.12)。BZ-X Analyzer を起動し、写真ファイルのグループ読み込みを行うタイムラプス写真の任意のチャンネルカラーのみを選択し、EGFP 発現細胞にピントの合ったベストフォーカス像を自動読み込みした。蛍光写真の霧除去機能である「ヘイズリダクション」をプレビュー5に選択し、画像処理から明るさ・コントラストの値を明るさ200、コントラスト255に設定し、写真の鮮明化を行い、写真のグループファイルをBCD形式で保存した。この値は、BZ-X Analyzer がカウントしたEGFP発現細胞数が目視でカウントしたものと同等の数値になる場合の設定である。

BCDファイルからEGFP発現細胞数を計測させるための基準となるマクロファイルを以下の手順で作成した。ハイブリットセルカウントを起動し、領域指定から写真の計測範囲を指定し、細胞の分離補正を最大値に設定し、EGFPの蛍光をできる限り分離した。解析した軽構造をMCD形式ファイルで保存した。マクロセルカウントを起動し、上記で作成したMCDファイルを条件設定させたファイル(BCDファイル)を一括で読み込みし、写真内の任意の閾値を越えたEGFP発現細胞を計測した。

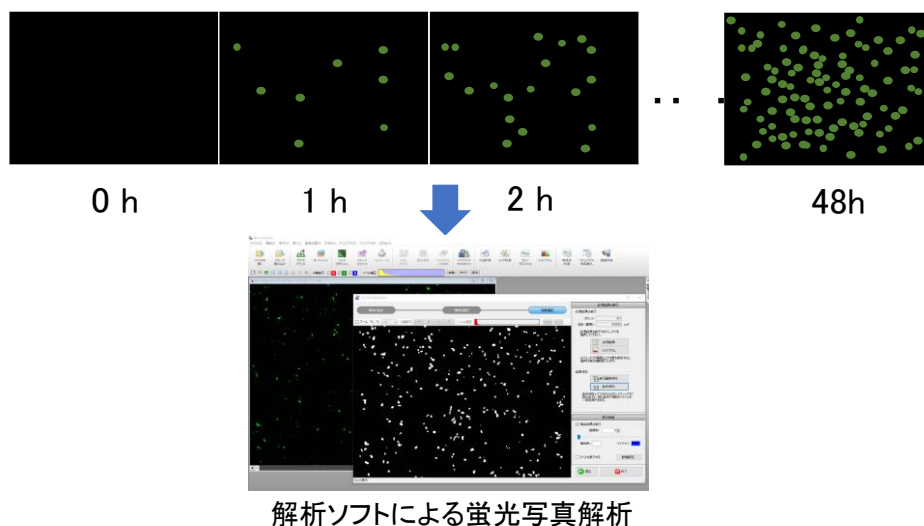


図 1.12 タイムラプス撮影と解析

### 1.3 結果

#### 1.3.1 ヒト乳腺由来の正常細胞とがん細胞の EGFP 発現細胞率の違い

同じヒト乳腺組織由来のがん細胞 MCF-7 と正常細胞 MCF-10A を使用して、それぞれの細胞にプラスミド DNA をトランスフェクションした。前培養で  $2 \times 10^4$  個/well 細胞を播種した MCF-7 及び MCF-10A に 0.2、0.3、0.4  $\mu\text{g/well}$  のプラスミド DNA をトランスフェクションし、2 時間ごとにタイムラプス撮影した。その結果を図 2.1 に示した。図 2.1 から、MCF-10A の場合は 0.4  $\mu\text{g/well}$  のプラスミド DNA 量をトランスフェクションした時の EGFP 発現細胞数が最も高く、MCF-7 の場合は 0.2  $\mu\text{g/well}$  と 0.4  $\mu\text{g/well}$  の DNA 試料で EGFP 発現細胞数に有意な差が見られなかった。また、MCF-7 では培養時間が 50 時間の時点でも増加し続ける傾向が見られたが、MCF-10A では培養時間 20 時間付近で EGFP 発現細胞数のピークを迎え、その後はゆるやかに減少した。EGFP 発現細胞の分裂及び細胞死による影響を除外するために、EGFP 発現細胞数が直線的に増加するインキュベート時間 10~20 時間間の EGFP 発現に着目した(図 2.2)。この時の EGFP 発現細胞数の増加量から最小二乗法による近似直線 ( $y = ax + b$ ) を求め、傾き  $a$  をそれぞれの DNA 量における EGFP 発現速度とした。縦軸に EGFP 発現速度を片対数で、横軸に DNA 量をプロットし、比較した結果を図 2.3 に示した。図 2.3 より、MCF-10A では DNA 量に比例して EGFP 発現速度が上昇した一方で、MCF-7 では DNA 量依存性は見られなかった。

同じヒト乳腺細胞由来であってもがん細胞の MCF-7 と正常細胞の MCF-10A では、プラスミド DNA のトランスフェクション後の EGFP 発現の動態が大きく異なることが分かった。

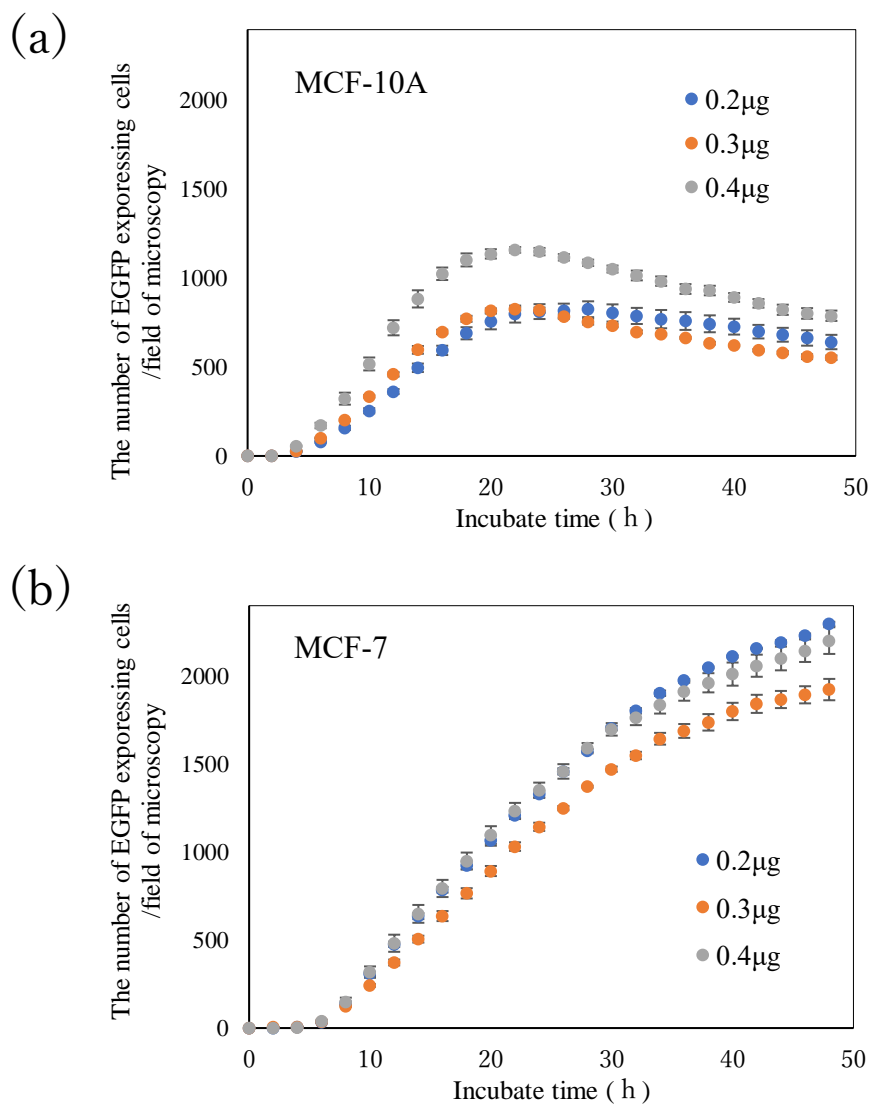


図 2.1 MCF-10A および MCF-7 の EGFP 発現細胞数の培養時間に対する変化と DNA 量依存性

(a) 正常ヒト乳腺細胞 MCF-10A にプラスミド DNA にトランスフェクションし、タイムラプス撮影で得られた蛍光写真の EGFP 発現細胞数をカウントした結果をプロットした。1well 当たり 0.2μg のプラスミド DNA をトランスフェクションした結果をブルーの線で、0.3μg をオレンジの線で、0.4μg をグレーの線で示す。エラーバーは、3 つの DNA 試料で得られた標準誤差を示す。

(b) ヒト乳腺がん細胞 MCF-7 のトランスフェクション結果をプロットした。

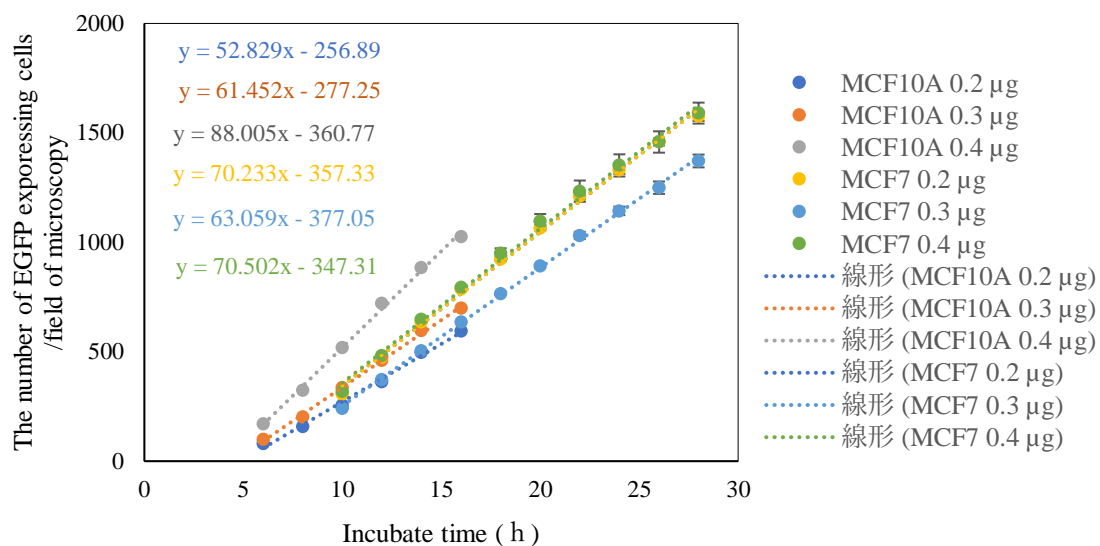


図 2.2 MCF-10A 及び MCF-7 における EGFP 発現細胞数の最大勾配

MCF-10A 及び MCF-7 の DNA 量に依存した EGFP 発現細胞数が直線的に増加している初期の培養時間データを抜き出した。MCF-10A はトランスフェクション後 6 時間から 16 時間の間、MCF-7 は 10 時間から 28 時間間の培養時間をプロットした。EGFP 発現細胞数の増加量から最小二乗法による線形近似直線を点線で示し、その時の数式を示した。

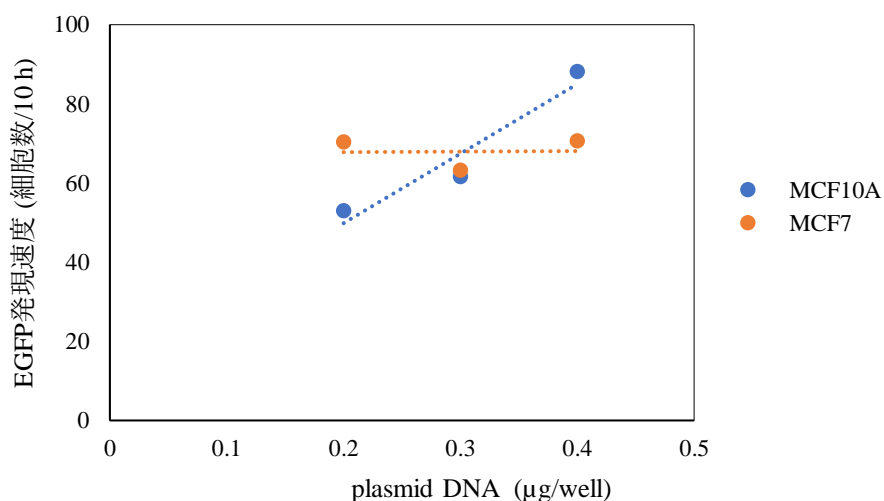


図 2.3 MCF-10A と MCF-7 の DNA 量に依存した EGFP 発現速度

トランスフェクション後の EGFP 発現細胞数の増加の最大勾配を最小二乗法によって算出した線形近似直線の傾きの変化をプロットした。MCF-10A の結果をブルーの線で MCF-7 の結果をオレンジの線で示した。



### 1.3.2 EGFP 遺伝子の発現の照射時の水分子環境の違い

水溶液、水和薄膜、乾燥薄膜のプラスミド DNA 試料に X 線を照射し、アガロースゲル電気泳動したゲル写真を図 2.4 に示した。ゲルの定量解析を行いバンド強度の測定結果より、Closed Circular form・Open Circular form・Linear form のそれぞれのプラスミド DNA の強度比からコンフォメーション構成比を求めたものを表 2 に示した。硬 X 線を照射したプラスミド DNA の各コンフォメーション構成比の線量依存性を図 2.5 に示した。それぞれの試料環境における硬 X 線を照射したプラスミド DNA の Closed Circular (以下 CC) の割合から導き出される生存率曲線を縦軸に片対数で CC 残存率を、横軸に吸収線量を図 2.6 にプロットした。

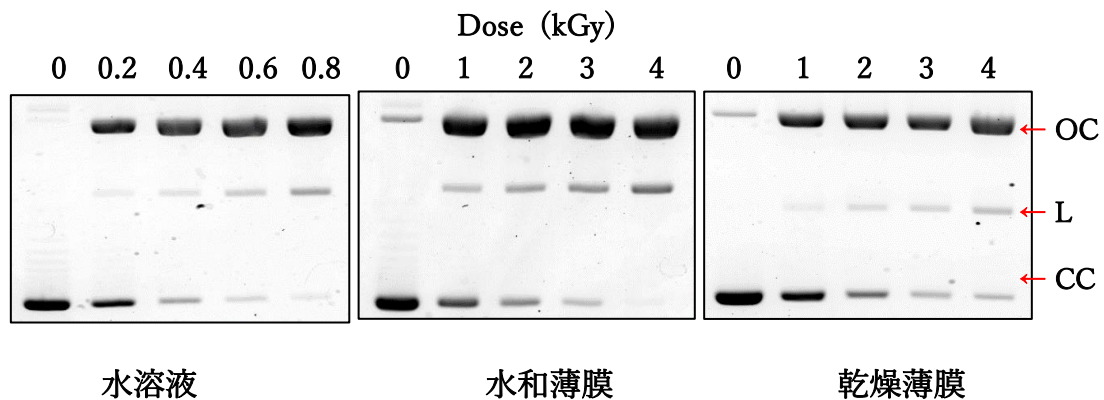


図 2.4 水分子環境の異なる照射プラスミド DNA のアガロースゲル電気泳動写真  
左上は水溶液プラスミド DNA、右上は水和薄膜のプラスミド DNA、中央下は乾燥薄膜のプラスミド DNA に硬 X 線を照射し電気泳動ゲル写真である。鎖切断損傷が生じていない Closed Circular form プラスミド DNA、1 つ以上の SSB が生じた Open Circular form DNA、DSB が生じた Linear form DNA のバンドの位置をそれぞれ矢印で示した。

表 2 水分子環境の異なる照射プラスミド DNA コンフォーメーション割合の線量依存性

吸収線量 (kGy)		0	0.2	0.4	0.6	0.8
水溶液	Closed Circular	0.985	0.397	0.186	0.079	0.054
	Open Circular	0.015	0.575	0.756	0.819	0.831
	Linear	0.000	0.028	0.058	0.102	0.115
水和	Closed Circular	0.907	0.507	0.317	0.241	0.149
	Open Circular	0.063	0.446	0.592	0.653	0.661
	Linear	0.03	0.047	0.091	0.105	0.19
乾燥	Closed Circular	0.967	0.502	0.286	0.131	0.113
	Open Circular	0.03	0.466	0.641	0.752	0.746
	Linear	0.003	0.032	0.073	0.117	0.141

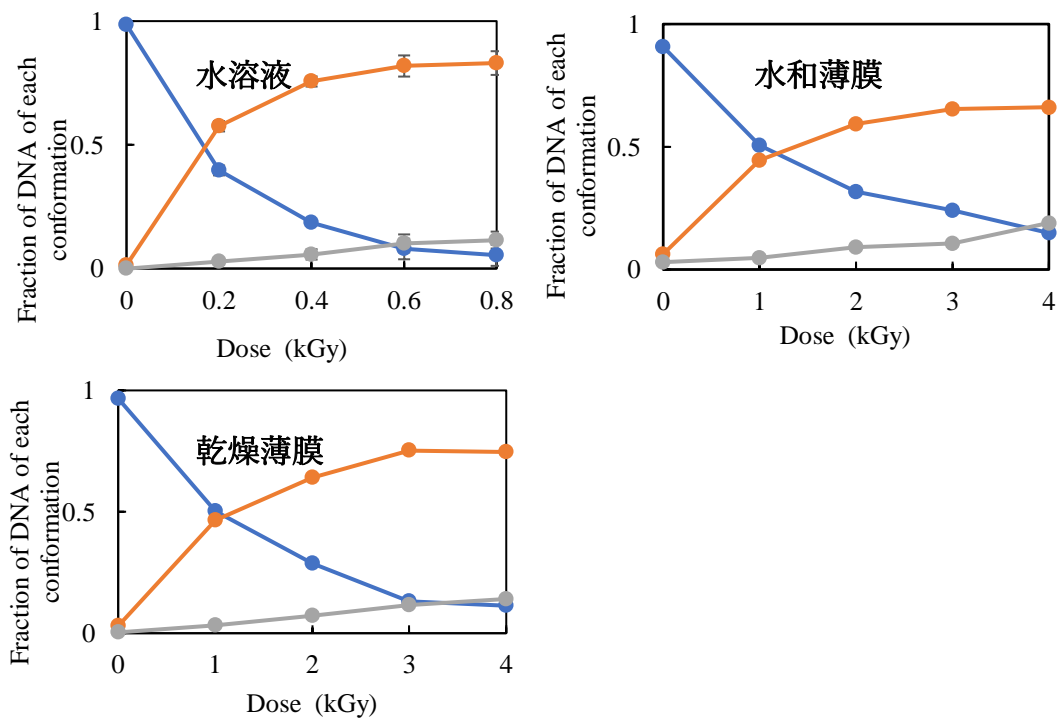


図 2.5 水分子環境の異なる照射プラスミド DNA の各コンフォーメーション割合の変化  
 水分子環境の異なる硬 X 線照射プラスミド DNA の線量に依存した各コンフォーメーションの割合を示した。Closed Circular form プラスミド DNA の割合をブルーの線で、Open Circular form プラスミド DNA の割合をオレンジの線で、Linear form プラスミド DNA の割合をグレーの線で示した。

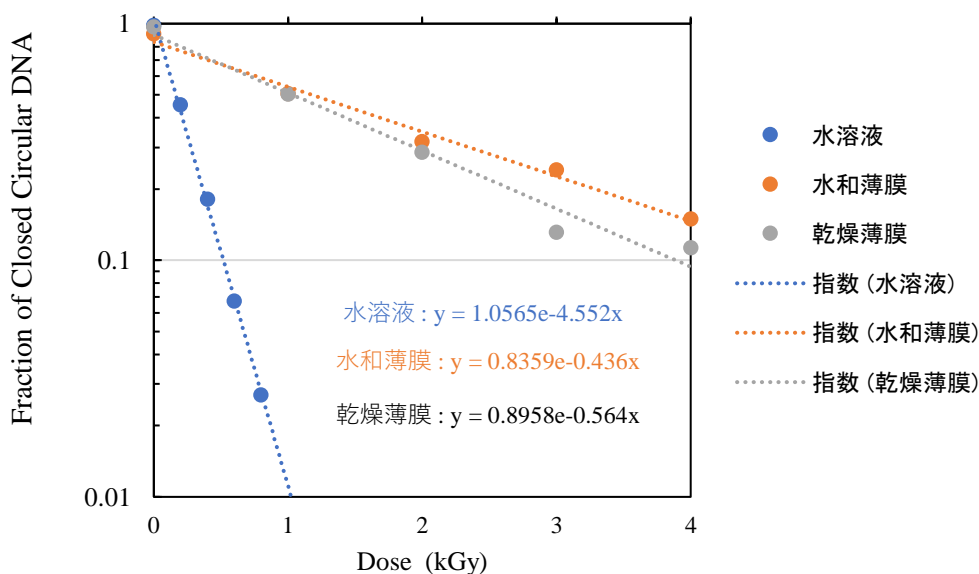


図 2.6 水分子環境の異なる照射プラスミド DNA の Closed Circular form 残存率

硬 X 線を照射したプラスミド DNA の Closed Circular 残存率を示した。CC 残存率が  $1/e$  を与える線量である  $D_{37}$  は水溶液が 0.22 kGy、水和薄膜が 2.29 kGy、乾燥薄膜が 1.77 kGy である。

水溶液、水和薄膜、乾燥薄膜のそれぞれの試料に  $1/e$  線量の硬 X 線を照射した。照射したそれぞれのプラスミド DNA をヒト乳がん細胞の MCF-7 ヘトランスフェクションした。トランスフェクション後の細胞をインキュベート 48 時間まで 1 時間ごとにタイムラプス撮影し、タイムラプス撮影写真から EGFP 発現細胞数をカウントした。計測結果を図 2.7 にプロットした。結果 1.3.1 (トランスフェクションの細胞株の検討) と同様に EGFP 発現細胞の分裂及び細胞死による影響を除外するために、EGFP 発現細胞数が直線的に増加していた EGFP 発現の最大勾配に着目した (図 2.8)。この時の EGFP 発現細胞数の増加の傾きを、最小二乗法による近似直線 ( $y = ax + b$ ) を求め、傾き  $a$  をそれぞれの  $D_{37}$  線量における EGFP 発現速度とした。Control を 1 としたときの  $D_{37}$  線量での発現速度を図 2.9 にプロットした。図 2.9 より EGFP 発現速度は水溶液 > 乾燥薄膜 > 水和薄膜の順に小さくなった。

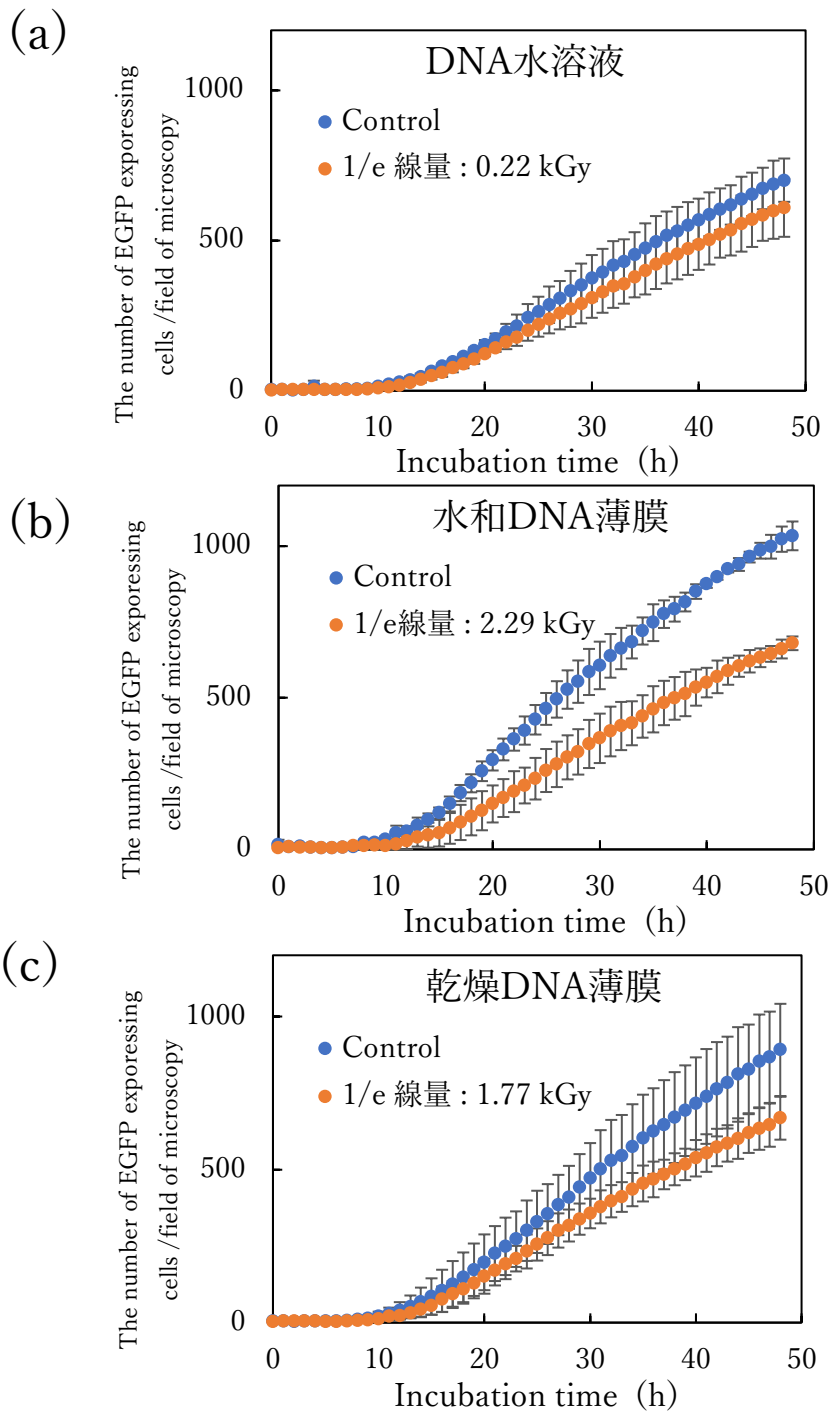


図 2.7 水分子環境の異なる照射プラスミド DNA 導入後の EGFP 発現細胞数の変化  
 (a) 1/e 線量の硬 X 線を水溶液環境で照射したプラスミド DNA を MCF-7 にトランスフェクションし、EGFP 発現細胞数をカウントした結果及び算出した標準誤差の培養時間に対する変化をプロットした。エラーバーは、3 回の実験で得られた標準偏差を示す。(b) 水和薄膜 DNA 試料の結果。(c) 乾燥薄膜 DNA 試料の結果。

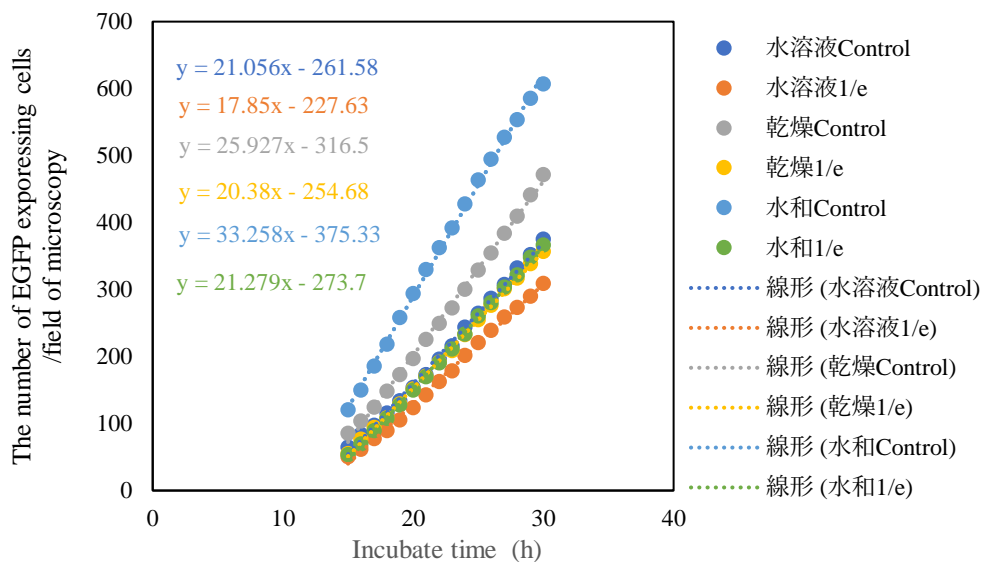


図 2.8 水分子環境の異なる照射プラスミド DNA 導入後の EGFP 発現細胞数の最大勾配  
水分子環境の異なる硬 X 線照射プラスミド DNA を MCF-7 にトランスフェクションした結果から、EGFP 発現細胞数が直線的に増加している初期の培養時間 15 時間から 30 時間のデータを抜き出した。EGFP 発現細胞数の増加量から最小二乗法による線形近似直線を点線で示し、その時の数式を示した。

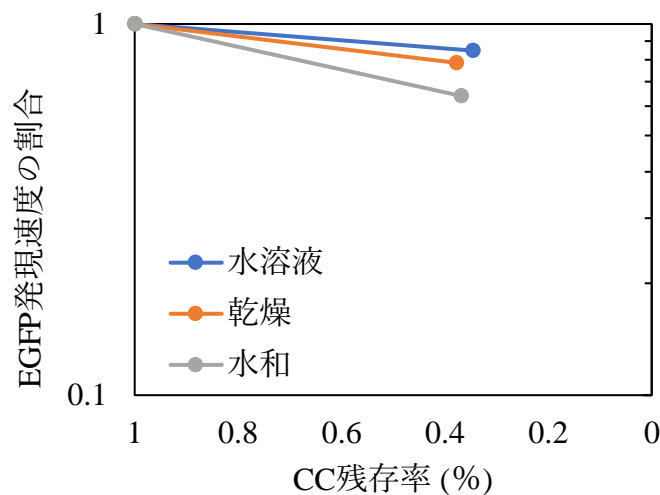


図 2.9 水分子環境の異なる 1/e 線量照射プラスミド DNA の EGFP 発現速度の変化  
1/e 線量の硬 X 線を照射したプラスミド DNA の EGFP 発現速度を求め、Control を 1 としたときの割合算出した。縦軸を EGFP 発現速度の割合、横軸を CC 残存率 (%) として水分子環境による変化をプロットした。水溶液 DNA の結果をブルーの線で、乾燥 DNA 薄膜の結果をオレンジの線で、水和 DNA の結果をグレーの線で示した。

### 1.3.3 硬 X 線照射したプラスミド DNA の非照射細胞における EGFP 遺伝子の発現

X 線発生装置による X 線（以下硬 X 線）を用いて、吸収線量 0.2 kGy から 1.2 kGy を照射したプラスミド DNA をアガロースゲル電気泳動したゲル写真の結果を図 2.10 に示した。電気泳動したゲルの定量解析を行いバンド強度の測定結果より、Closed Circular form・Open Circular form・Linear form のそれぞれのプラスミド DNA の強度比からコンフォメーション構成比を求めたものを表 2.1 に示した。硬 X 線を照射したプラスミド DNA の各コンフォメーション構成比の線量依存性を図 2.11 に示した。1200 Gy の硬 X 線を照射すると Closed Circular form のプラスミド DNA が非常に少なるため、1 つ以上の SSB が生じた Open Circular form あるいは複数の SSB が近傍に生じることで DSB が生じた Linear form へと損傷形態が変化した。硬 X 線を照射したプラスミド DNA の Closed Circular (以下 CC) の割合から導き出される生存率曲線を縦軸に片対数で CC 残存率を、横軸に吸収線量を図 2.12 にプロットした。図 2.12 より CC 残存率の  $1/e$  線量は 252 Gy であることが示された。その計算方法の詳細は 2 章の結果 2.3.4 に示した。

吸収線量 0.2 kGy から 1.2 kGy の硬 X 線を照射したプラスミド DNA を正常ヒト乳腺細胞 MCF-10A 及び、ヒト乳腺がん細胞の MCF-7 へトランスフェクションした。トランスフェクション後の細胞をインキュベート 48 時間まで 1 時間ごとにタイムラプス撮影し、蛍光写真から EGFP 発現細胞数をカウントした。すべての培養時間及び吸収線量における計測結果を、縦軸に EGFP 発現細胞数、横軸に培養時間を図 2.13 にプロットした。図 2.13 より、硬 X 線を照射したプラスミド DNA を非照射の細胞にトランスフェクションすると、EGFP 発現細胞数は線量依存的に減少しているが高線量域は減少が小さくなった。また、MCF-7 はトランスフェクション後から 10 時間以内には EGFP 発現細胞数の増加が開始される一方で、正常細胞である MCF-10A は EGFP 発現細胞数の増加の開始時点が遅く、48 時間における EGFP 発現細胞数は 50%ほど低かった。結

果 1.3.1 (トランスフェクションの細胞株の検討)と同様に EGFP 発現細胞数が直線的に増加していた EGFP 発現の最大勾配に着目し(図 2.14)、最小二乗法による近似直線 ( $y = ax + b$ ) を求め、傾き  $a$  を EGFP 発現速度とした。Control を1としたときの2種類の細胞株における吸収線量での発現速度の割合を、縦軸に EGFP 発現速度を片対数で、横軸に吸収線量として図 2.15 にプロットし比較した。図 2.15 より MCF-7 における EGFP 発現速度の傾きは MCF-10A の約 60%大きく、線量に強く依存して EGFP 発現速度が低下することが示された。いずれの細胞株においても吸収線量 0.8 kGy 以上の高線量域においては EGFP 発現速度の傾きが小さくなり、減少量の飽和が示された。以降の放射線照射したプラスミド DNA のトランスフェクション実験ではヒト乳腺がん細胞である MCF-7 のみを使用した。

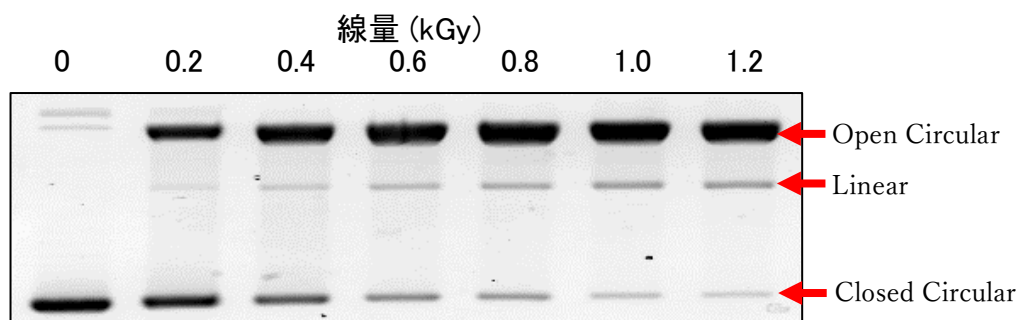


図 2.10 硬 X 線照射プラスミド DNA のアガロースゲル電気泳動写真

左から非照射のプラスミド DNA (0 Gy)、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 kGy 照射したプラスミド DNA の順で電気泳動した。鎖切断損傷が生じていない Closed Circular form プラスミド DNA、1 つ以上の SSB が生じた Open Circular form DNA、DSB が生じた Linear form DNA のバンドの位置をそれぞれ矢印で示した。

表 2.1 硬 X 線照射プラスミド DNA コンフォメーション割合の線量依存性

吸収線量 (kGy)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
Closed Circular	0.985	0.397	0.186	0.079	0.054	0.016	0.001
Open Circular	0.015	0.575	0.756	0.819	0.831	0.821	0.801
Linear	0.000	0.028	0.058	0.102	0.115	0.163	0.198



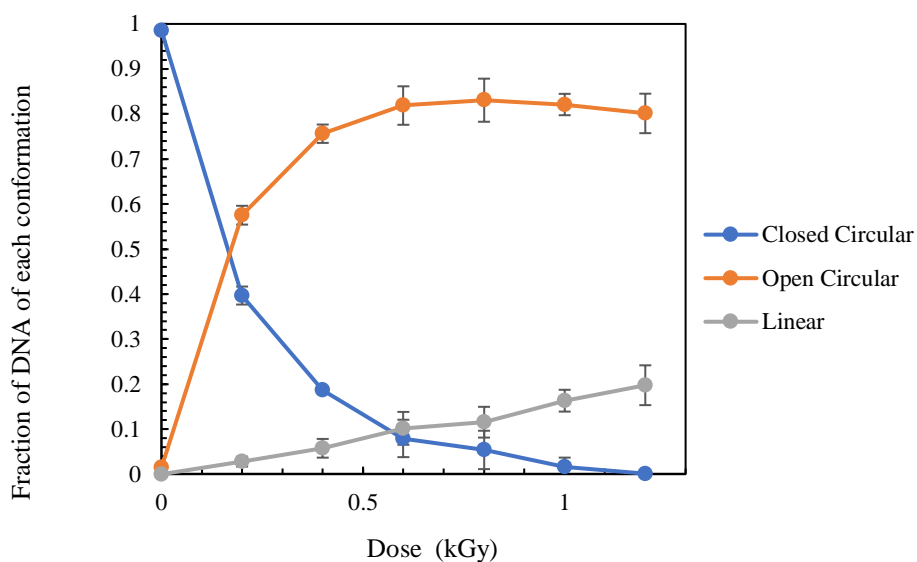


図 2.11 硬 X 線照射プラスミド DNA の各コンフォメーション割合の線量依存性

硬 X 線を照射したプラスミド DNA の線量に依存した各コンフォメーションの割合を示した。Closed Circular form プラスミド DNA の割合をブルーの線で、Open Circular form プラスミド DNA の割合をオレンジの線で、Linear form プラスミド DNA の割合をグレーの線で示した。エラーバーは 4 つの DNA 試料の標準偏差を示す。

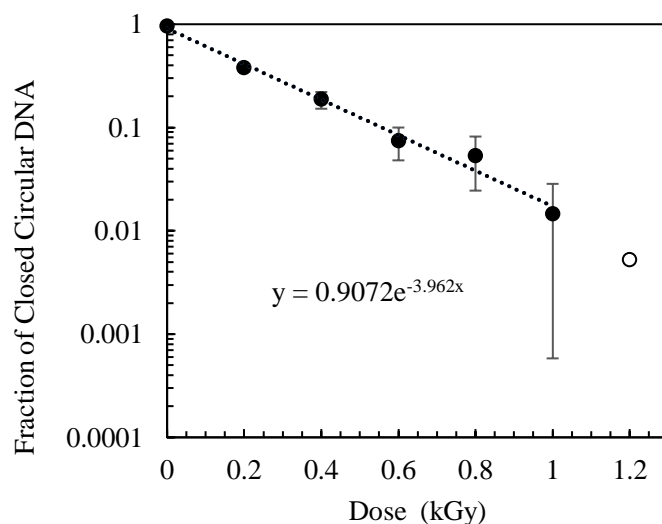


図 2.12 硬 X 線照射プラスミド DNA の Closed Circular form 残存率

硬 X 線を照射したプラスミド DNA の Closed Circular 残存率を示した。CC 残存率が  $1/e$  を与える線量である  $D_{37}$  線量は 252 Gy である。エラーバーは 4 つの DNA 試料の標準偏差を示す。

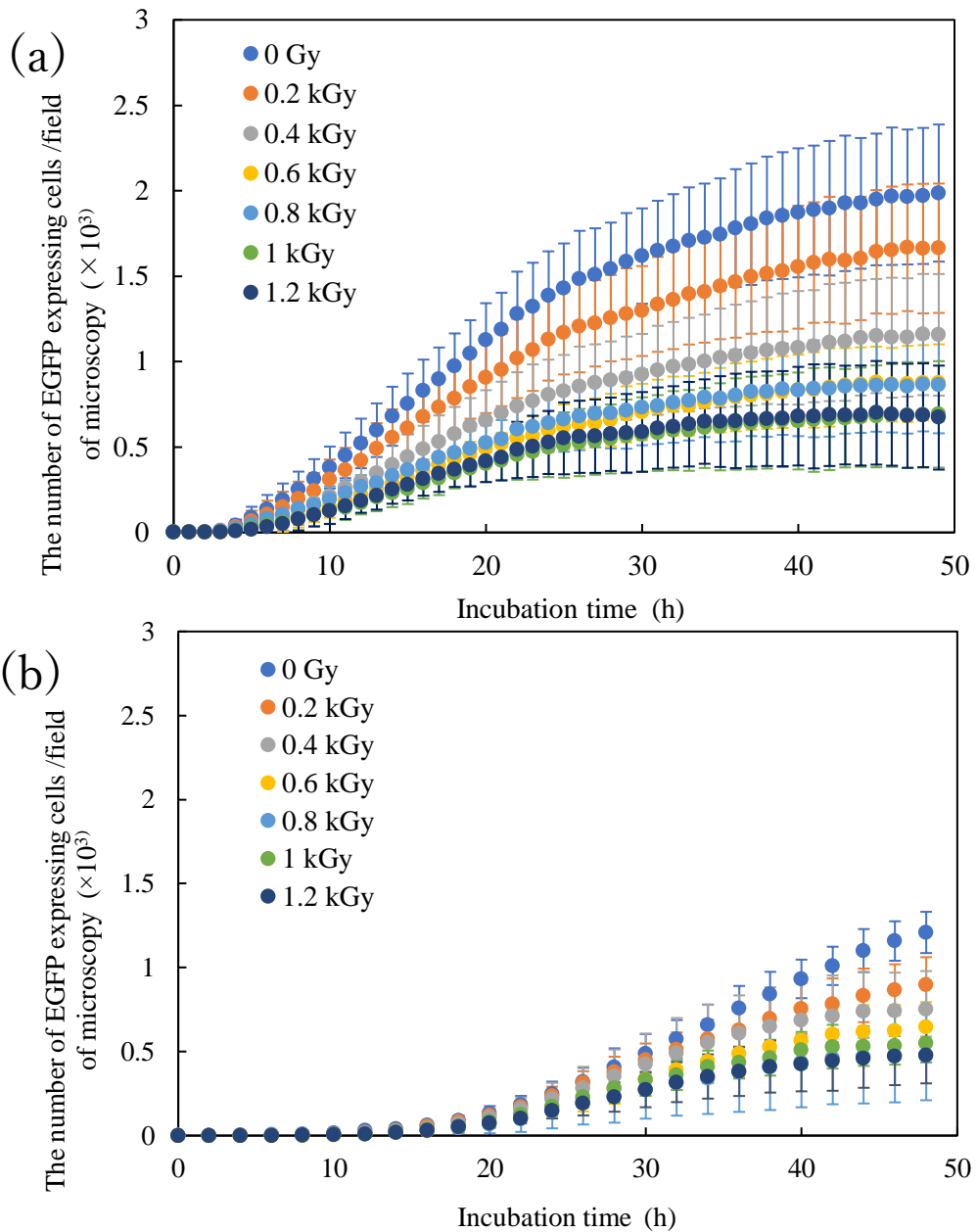


図 2.13 硬 X 線照射 DNA 導入後の EGFP 発現細胞数の変化

(a) 硬 X 線を照射したプラスミド DNA をヒト乳がん細胞である MCF-7 にトランスフェクションし、1 時間ごとに撮影した蛍光写真を解析した。全ての EGFP 発現細胞数をカウントした結果及び算出した標準誤差の培養時間に対する変化をプロットした。エラーバーは、6 回の実験で得られた標準誤差を示す。(b) 同様に正常ヒト乳腺細胞である MCF-10A にトランスフェクションした結果を示した。エラーバーは、3 回の実験で得られた標準誤差を示す。

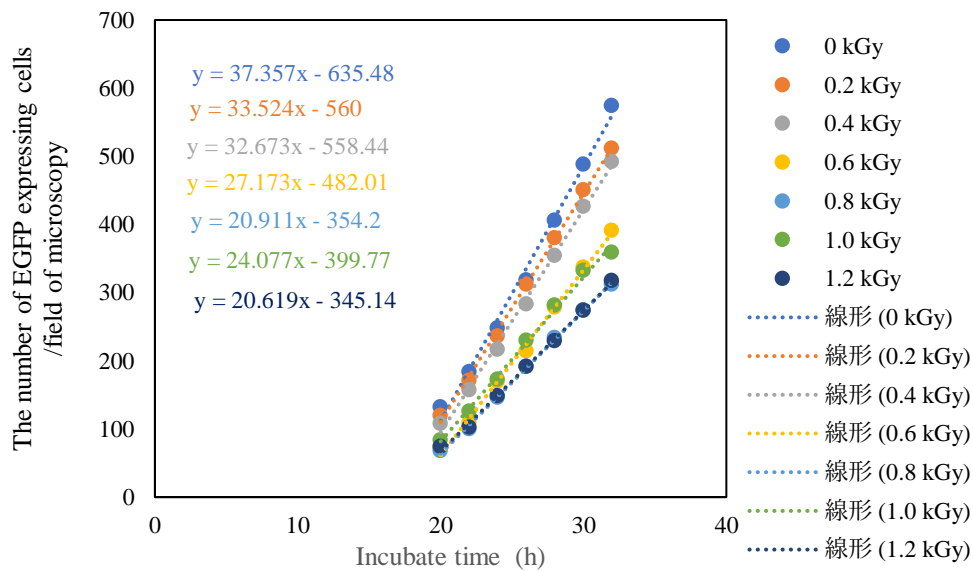
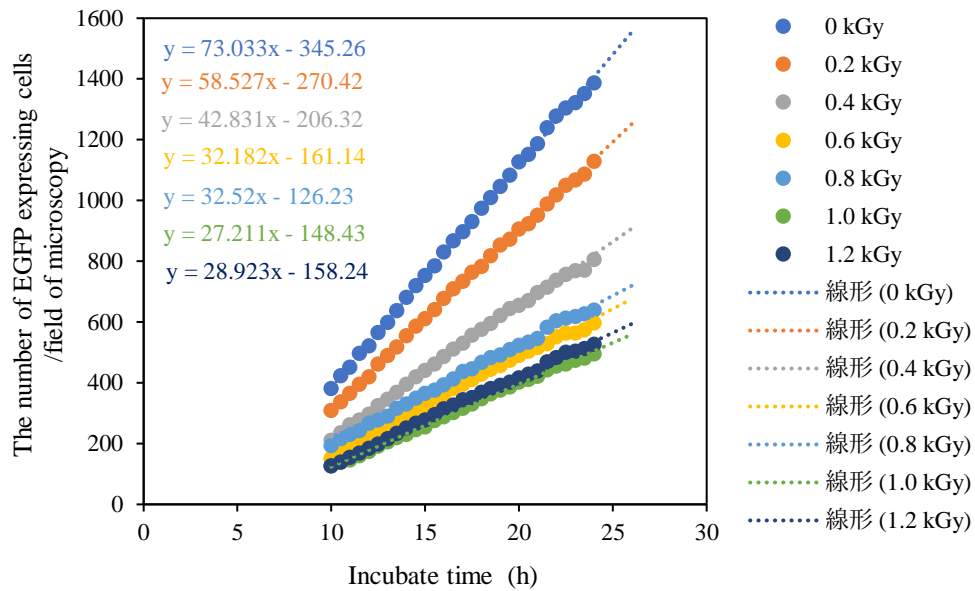


図 2.14 硬 X 線照射 DNA 導入後の EGFP 発現細胞数の最大勾配

硬 X 線を照射した DNA を MCF-10A 及び MCF-7 にトランスフェクションした結果からの EGFP 発現細胞数が直線的に増加している初期の培養時間データを抜き出した。EGFP 発現細胞数の増加量から最小二乗法による線形近似直線を点線で示し、その時の数式を示した。(a) MCF-7 の培養時間 10 時間から 25 時間間の EGFP 発現細胞数を抜き出した。(b) MCF-10A の培養時間 20 時間から 25 時間間の EGFP 発現細胞数を抜き出した。

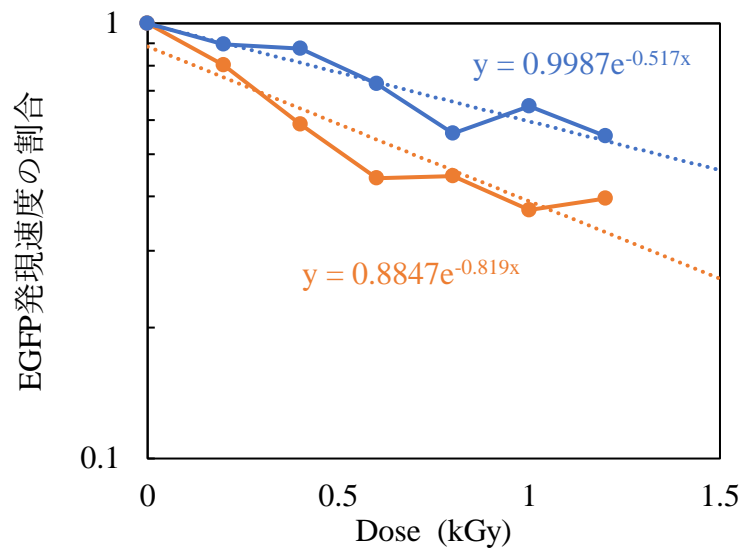


図 2.15 硬 X 線の線量に依存した MCF-7 と MCF-10A の EGFP 発現速度の割合  
 トランスフェクション後の EGFP 発現細胞数の増加の最大勾配を最小二乗法によって算出し  
 た線形近似直線の傾きの変化をプロットした。MCF-10A の結果をブルーの線で MCF-7 の結  
 果をオレンジの線で示した。

#### 1.3.4 軟 X 線照射したプラスミド DNA の非照射細胞における EGFP 遺伝子の発現

軟 X 線照射装置を用いて、リンの K 殻共鳴ピークである 2.153 keV とその前後の 2.147 keV 及び 2.160 keV の単色軟 X 線をプラスミド DNA へ照射した。照射したプラスミド DNA のアガロースゲル電気泳動結果を図 2.16 に、プラスミド DNA のコンフォメーション構成比を表 2.2 に、各コンフォメーションの線量依存性を比較したものを図 2.17 に示した。さらにプラスミド DNA の Closed Circular form 残存率を図 2.18 に示した。リン原子は DNA の分子骨格を形成する主要な元素であり、この K 殻を励起することで分子鎖切断を効率よく起こすことができると考えられる。しかし図 2.18 より、DNA の鎖切断頻度は、リン K 殻共鳴励起の有無で大きな違いはみられなかった。

リンの K 殻共鳴ピークである 2.153 keV とその前後の単色軟 X 線における  $1/e$  線量を調べ、これを照射したプラスミド DNA をそれぞれ MCF-7 ヘトランスフェクションし、EGFP 発現細胞数をカウントした結果を図 2.19 にプロットした。結果 1.3.1 (トランスフェクションの細胞株の検討)と同様に EGFP 発現細胞数が直線的に増加しているインキュベーション時間 15~30 時間における EGFP 発現速度の比較を図 2.20 に示した。Control を 1 としたときのそれぞれの吸収線量での発現速度の変化の割合を求め、縦軸に片対数で EGFP 発現速度を、横軸に CC 残存率を図 2.21 にプロットした。図 2.21 より、2153 及び 2160 eV の単色 X 線を照射したプラスミド DNA をトランスフェクションしたときの EGFP 発現速度は 2147 eV と比較して、低くなることが示された。これはリンの K 殻励起及びイオン化が起こることにより難修復性の DNA 損傷が誘発されていると考えられる。

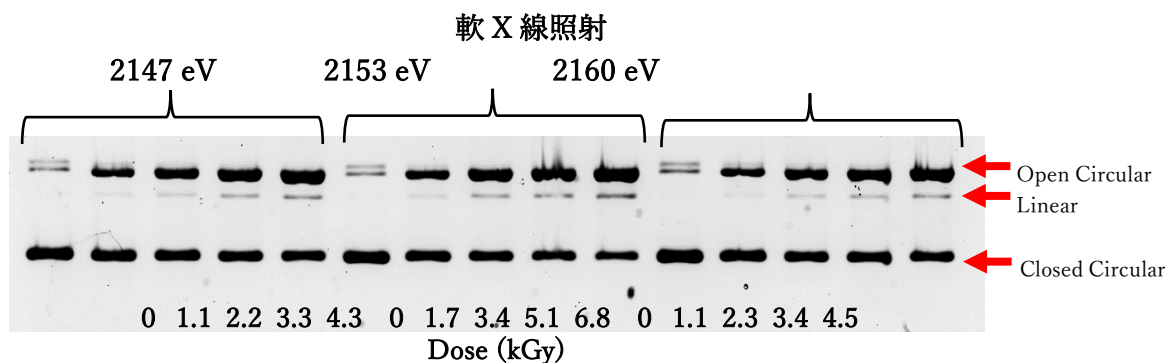


図 2.16 軟 X 線照射プラスミド DNA のアガロースゲル電気泳動写真

左から 2147 eV、2153 eV 単色、2160 eV の X 線照射したプラスミド DNA を電気泳動した。それぞれの吸収線量及び、Closed Circular form プラスミド DNA、Open Circular form DNA、Linear form DNA のバンドの位置をそれぞれ矢印で示した。

表 2.2 軟 X 線照射プラスミド DNA コンフォメーション割合の線量依存性

吸収線量 (kGy)	0	1.1	2.2	3.3	4.3
Closed Circular	0.930	0.713	0.607	0.545	0.466
Open Circular	0.068	0.279	0.376	0.428	0.499
Linear	0.002	0.008	0.018	0.027	0.035
吸収線量 (kGy)	0	1.7	3.4	5.1	6.8
Closed Circular	0.940	0.648	0.500	0.446	0.322
Open Circular	0.059	0.340	0.475	0.522	0.626
Linear	0.001	0.012	0.025	0.031	0.052
吸収線量 (kGy)	0	1.1	2.3	3.4	4.5
Closed Circular	0.937	0.726	0.589	0.546	0.465
Open Circular	0.063	0.267	0.397	0.432	0.508
Linear	0.000	0.006	0.014	0.022	0.027

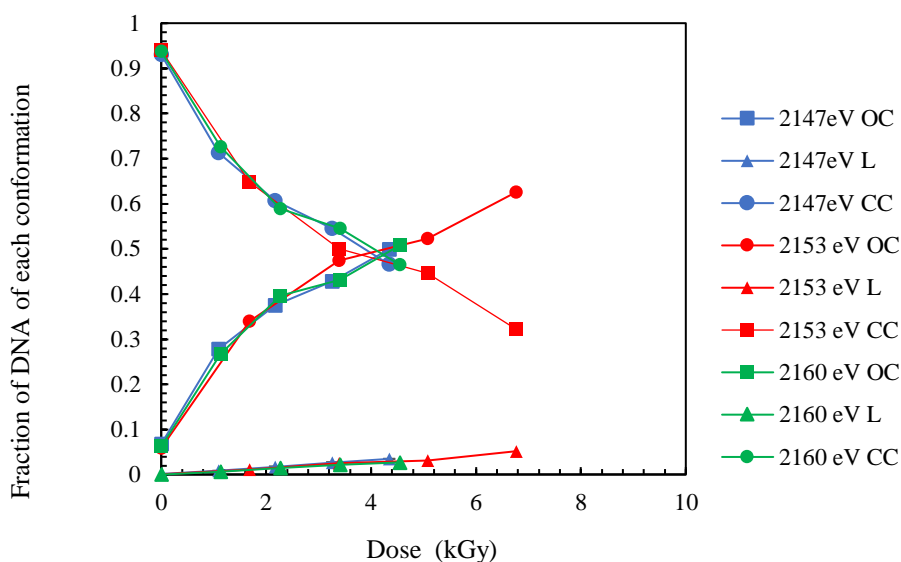


図 2.17 軟 X 線照射プラスミド DNA の各コンフォメーション割合の線量依存性

軟 X 線を照射したプラスミド DNA の線量に依存した各コンフォメーションの割合を示した。Closed Circular form プラスミド DNA の割合をブルーの線で、Open Circular form プラスミド DNA の割合をオレンジの線で、Linear form プラスミド DNA の割合をグレーの線で示した。

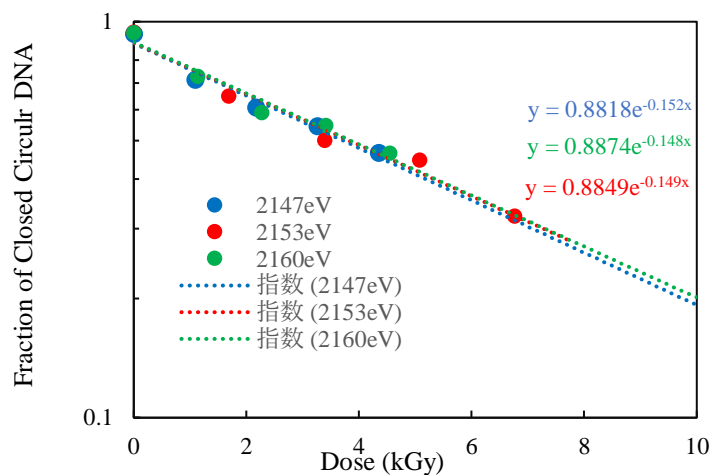


図 2.18 軟 X 線照射プラスミド DNA の Closed Circular form 残存率

軟 X 線を照射したプラスミド DNA の Closed Circular 残存率を示した。CC 残存率が  $1/e$  を与える線量である  $D_{37}$  線量は 2147 eV では 6.58 kGy、2153 eV では 6.71 kGy、2160 eV では 6.76 kGy である。

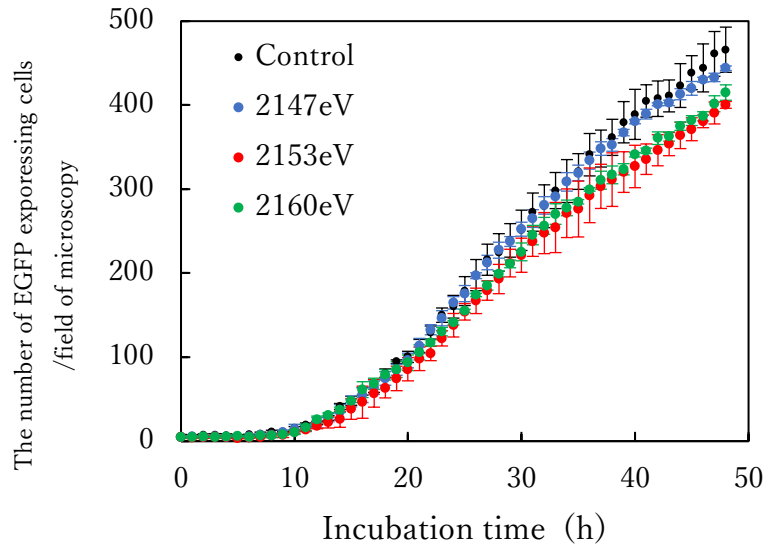


図 2.19 軟 X 線照射 DNA 導入後の EGFP 発現細胞数の変化

軟 X 線を照射したプラスミド DNA をヒト乳がん細胞である MCF-7 にトランスフェクションし、1 時間ごとに撮影した蛍光写真を解析した。全ての EGFP 発現細胞数をカウントした結果及び算出した標準誤差の培養時間に対する変化をプロットした。エラーバーは、3 回の実験で得られた標準偏差を示す。

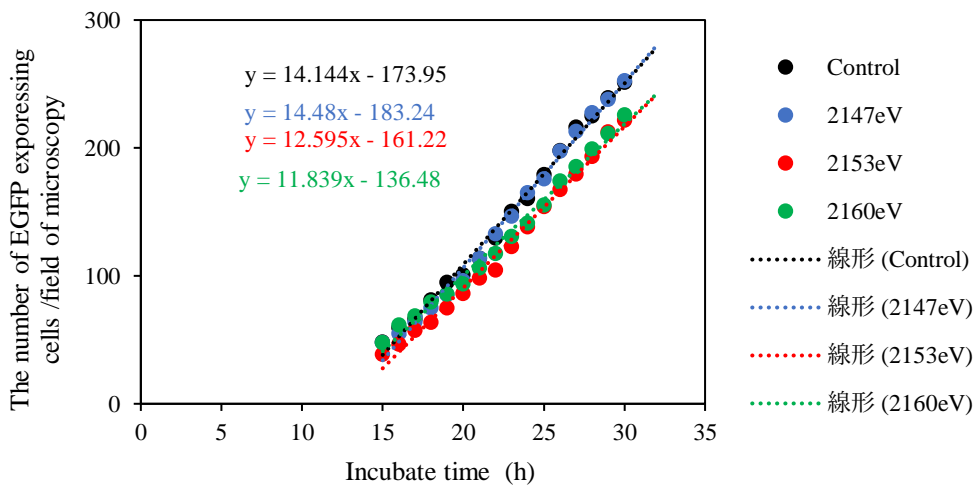


図 2.20 軟 X 線照射 DNA 導入後の EGFP 発現細胞数の最大勾配

軟 X 線を照射した DNA を MCF-7 にトランスフェクションした結果からの EGFP 発現細胞数が直線的に増加している初期の培養時間 15 時間から 30 時間の間データを抜き出した。EGFP 発現細胞数の増加量から最小二乗法による線形近似直線を点線で示し、その時の数式を示した。



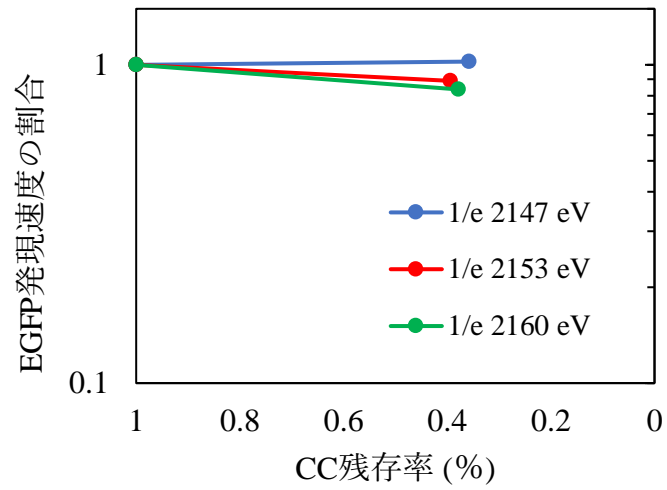


図 2.21 1/e 線量の軟 X 線を照射した DNA の EGFP 発現速度の割合  
 リンの K 殻共鳴ピークである 2.153 keV とその前後の 2.147 keV 及び 2.160 keV の単色軟 X  
 線を照射した DNA をトランスフェクションし、EGFP 発現細胞数の増加の最大勾配を最小二  
 乗法によって算出した線形近似直線の傾きの変化をプロットした。2147 eV の結果をブルー  
 の線で、2153 eV の結果をレッドの線で、2160 eV の結果をグリーンの線で示した。

### 1.3.5 Ne<sup>10+</sup>線を照射したプラスミド DNA の非照射細胞内における EGFP 遺伝子の発現

Ne<sup>10+</sup>イオンビーム（以下 Ne 線）を用いて、吸収線量が 504 Gy、1505 Gy、2006 Gy となるように照射したプラスミド DNA のアガロースゲル電気泳動結果を図 2.22 に、それぞれのプラスミド DNA のコンフォメーション構成比を表 2.3 に、Ne 線及び比較のための硬 X 線照射の各コンフォメーションの線量依存性を比較したものを図 2.23 に示す。Ne 線の場合、各コンフォメーション構成比から、1.5 Gy 以上照射した DNA 試料では Closed Circular のバンドがほぼ完全に見えなくなり、SSB、DSB あるいはその両方が生じるような損傷形態に変化することが示された。Ne 線は硬 X 線と比較して Linear form の割合が 15%ほど高く、その分量だけ Open Circular form の割合が高かった。吸収線量あたりのプラスミド DNA のコンフォメーション割合は、Ne 線照射 DNA の方が硬 X 線照射より DSB が誘発されやすいことが示された。

Ne 線を照射したプラスミド DNA と Ne 線と同吸収線量の硬 X 線を照射したプラスミド DNA を MCF-7 ヘトランスフェクションし、EGFP 発現細胞数をカウントした結果をそれぞれ図 2.24 にプロットした。硬 X 線照射した DNA 試料では EGFP 発現細胞数は線量依存的に減少しており、結果 1.3.3 (X 線照射した DNA の遺伝子発現) と同様に高線量域では減少量の飽和が示される結果が得られた。Ne 線を照射した DNA 試料では、1.505 kGy で飽和し、2.006 kGy 照射した試料の間に有意な差が見られなかった。

結果 1.3.1 (トランスフェクションの細胞株の検討) と同様に EGFP 発現細胞数が直線的に増加しているインキュベート時間 10~24 時間における EGFP 発現速度の比較を図 2.25 に示した。Control を 1 としたときのそれぞれの吸収線量での発現速度の変化の割合を求め、縦軸に片対数で EGFP 発現速度を、横軸に吸収線量を図 2.26 にプロットした。図 2.26 より、Ne 線を照射した試料の EGFP 発現速度がわずかではあるが低くなることが示された。この結果により、X 線より LET の大きな Ne 線の方が DNA に

対して難修復性の損傷を誘発させていることが示唆された。しかし、2.006 kGy においては EGFP 発現速度の差は小さくなることから、ある程度の高線量域では損傷が飽和し、LET に関わらず、修復困難な DNA の量が増えるため、EGFP 発現速度に差が生じなくなったと考えられる。

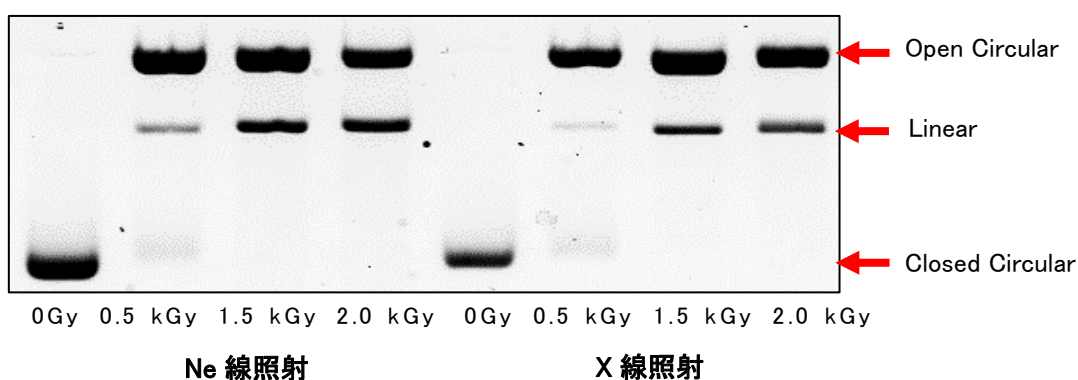


図 2.22 Ne 線及び X 線照射プラスミド DNA のアガロースゲル電気泳動像

表 2.3 プラスミド DNA コンフォメーション割合の線量依存性

吸収線量 (kGy)	0 (実験ホール内)	0.5	1.5	2.0
Ne 線 Closed Circular	0.989	0.049	0.000	0.001
Ne 線 Open Circular	0.010	0.843	0.692	0.614
Ne 線 Linear	0.001	0.108	0.308	0.385
X 線 Closed Circular	0.984	0.079	0.000	0.000
X 線 Open Circular	0.010	0.872	0.818	0.780
X 線 Linear	0.006	0.049	0.181	0.219

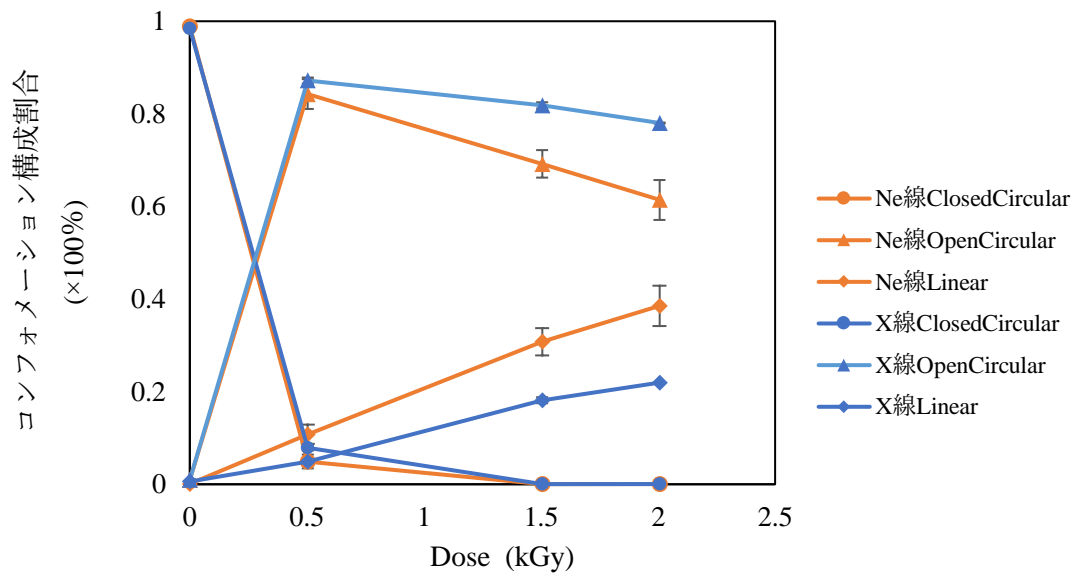


図 2.23 Ne 線、X 線照射プラスミド DNA の各コンフォメーション割合の線量依存性  
 エラーバーは、3 つの DNA 試料で得られた標準誤差を示す。

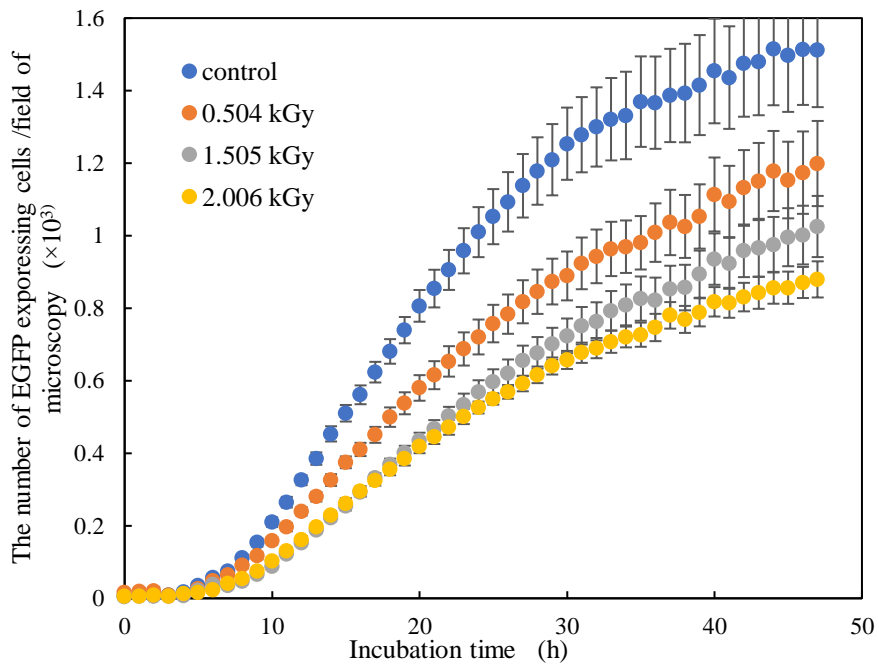
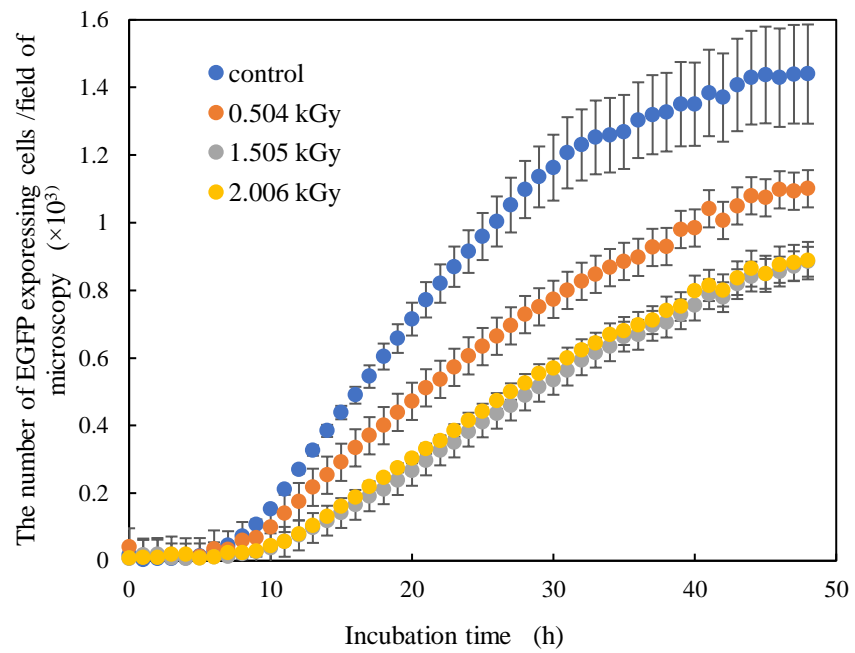


図 2.24 Ne 線照射同吸収線量 X 線照射 DNA 導入後の EGFP 発現細胞数の変化  
エラーバーは、3 つの DNA 試料で得られた標準誤差を示す。

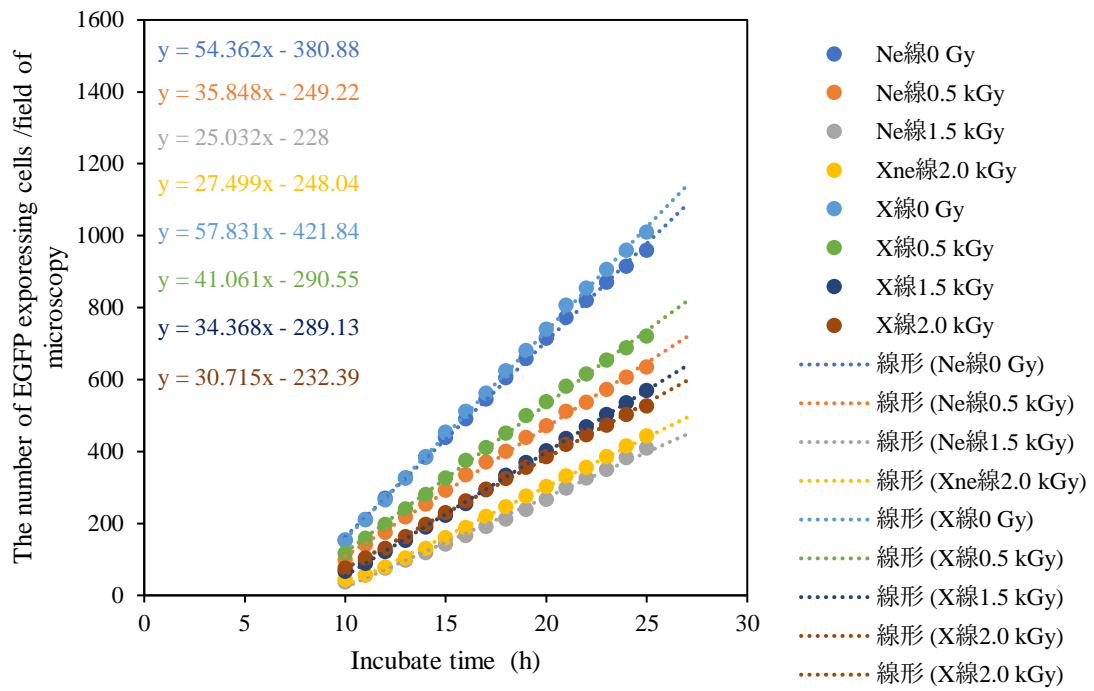


図 2.25 Ne 線及び X 線照射 DNA 試料の EGFP 発現細胞数の増加

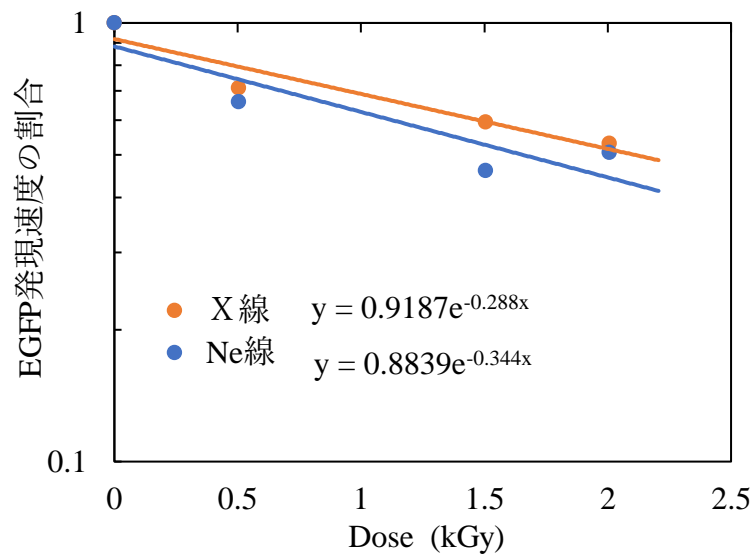


図 2.26 Ne 線と X 線の EGFP 発現速度の割合

### 1.3.6 C<sup>6+</sup>線を照射したプラスミド DNA の非照射細胞内における EGFP 遺伝子の発現

C<sup>6+</sup>イオンビーム（以下 C 線）を用いて、トリスモル濃度（以下トリス濃度）10mM と 208mM となるように調整し、OH ラジカル等をスキャベンジする効果を変えたプラスミド DNA 溶液試料に対して、吸収線量 0.2 kGy から 1.2 kGy まで 0.2 kGy 毎に照射した。プラスミド DNA 試料をアガロースゲル電気泳動したゲル写真を図 2.27 に、プラスミド DNA のコンフォメーション構成比を表 2.4 に、C 線照射 DNA の各コンフォメーションの線量依存性を比較したものを図 2.28、図 2.29 に示した。プラスミド DNA の Closed Circular form と Open Circular form の割の交点の吸収線量における Linear form の割合を比較すると、トリス濃度 10mM の時は 4 %程度である一方で、トリス濃度 208 mM の時はその 1.5 倍以上高い 7%を示した。Linear の分画が増加したということは DSB の生成効率が高くなったことを意味している。高濃度のトリス環境下では OH ラジカルがトリスに捕捉され間接効果が低く抑えられおり、相対的に直接効果の影響が強調される。プラスミド DNA の Closed Circular form（以下 CC）の割合から導き出される生存率曲線を縦軸に片対数で CC 残存率を、横軸に吸収線量を図 2.30 にプロットした。CC 残存率が 1/e を与える線量である D<sub>37</sub> 線量は、DNA 水溶液試料中に含まれるトリス濃度が 10 mM の時は 0.9 kGy、208 mM の時は 1.5 kGy であることが示された。これをそれぞれのトリス濃度のプラスミド DNA に照射し、アガロースゲル電気泳動法により CC 残存率が 1/e 程度であることを確認した。この時の CC 残存率を図 2.30 上にプロットした。

トリス濃度の異なる DNA 水溶液試料にそれぞれの D37 線量の C 線を照射したプラスミド DNA を MCF-7 ヘトランスフェクションし、タイムラプス撮影した。蛍光写真から EGFP 発現細胞数をカウントした結果をそれぞれ図 2.31 (a,b) にプロットした。比較のために D37 線量の硬 X 線を照射したプラスミド DNA を用いたトランスフェクション結果も図 2.31 (c) に示した。MCF-7 ヘトランスフェクションしその結果、D37 線量を照射

したすべての DNA の EGFP 発現細胞数はコントロールと比較して線質及びトリス濃度に関わらず減少した。その減少量は硬 X 線に比べて C 線を照射した DNA はどちらも大きく減少しており、その減少量のトリス濃度による違いに有意な差が見られなかった。結果 1.3.1 (トランスフェクションの細胞株の検討) と同様に EGFP 発現細胞数が直線的に増加しているインキュベート時間 10~24 時間における EGFP 発現速度の比較を図 2.32 に示した。Control を 1 としたときのそれぞれの吸収線量での発現速度の変化の割合を求め、縦軸に片対数で EGFP 発現速度を、横軸に吸収線量を図 2.33 にプロットした。



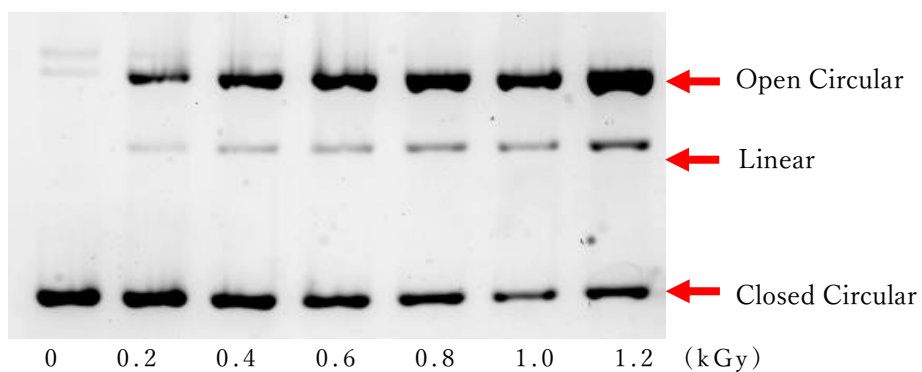


図 2.27 C 線照射プラスミド DNA のアガロースゲル電気泳動像

表 2.4 C 線照射プラスミド DNA コンフォメーション割合の線量依存性

10 mM	吸収線量 (kGy)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
	Closed Circular	0.994	0.799	0.640	0.509	0.399	0.319	0.264
	Open Circular	0.006	0.187	0.332	0.449	0.541	0.607	0.649
	Linear	0.000	0.014	0.028	0.041	0.059	0.074	0.086
208 mM	吸収線量 (kGy)	0	0.9	1.8	2.7	3.6	4.5	
	Closed Circular	0.985	0.482	0.288	0.182	0.079	0.046	
	Open Circular	0.015	0.445	0.583	0.645	0.692	0.683	
	Linear	0.000	0.073	0.129	0.174	0.229	0.271	

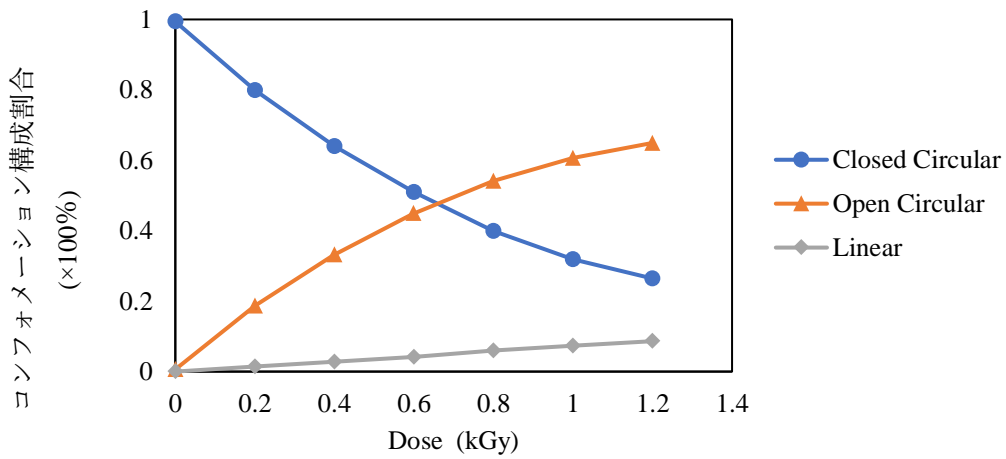


図 2.28 C 線照射トリス濃度 10mMDNA の各コンフォメーション割合の線量依存性

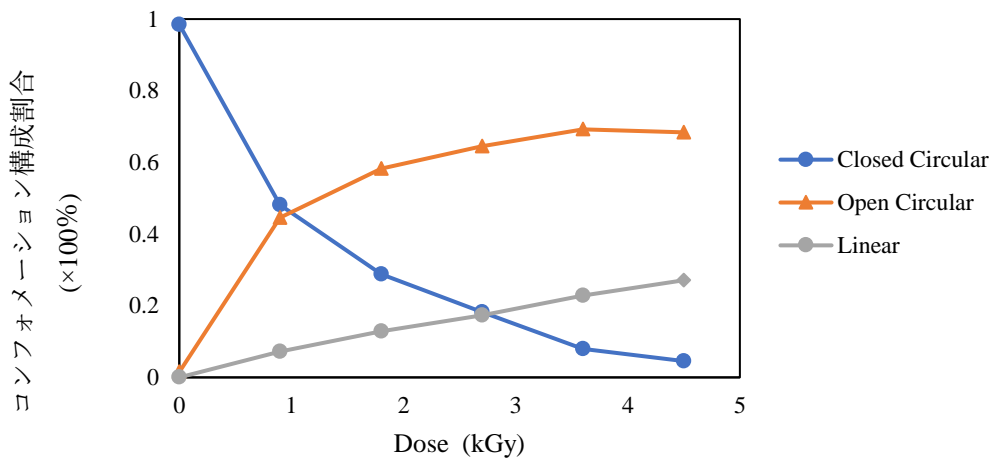


図 2.29 C 線照射トリス濃度 208mMDNA の各コンフォメーション割合の線量依存性

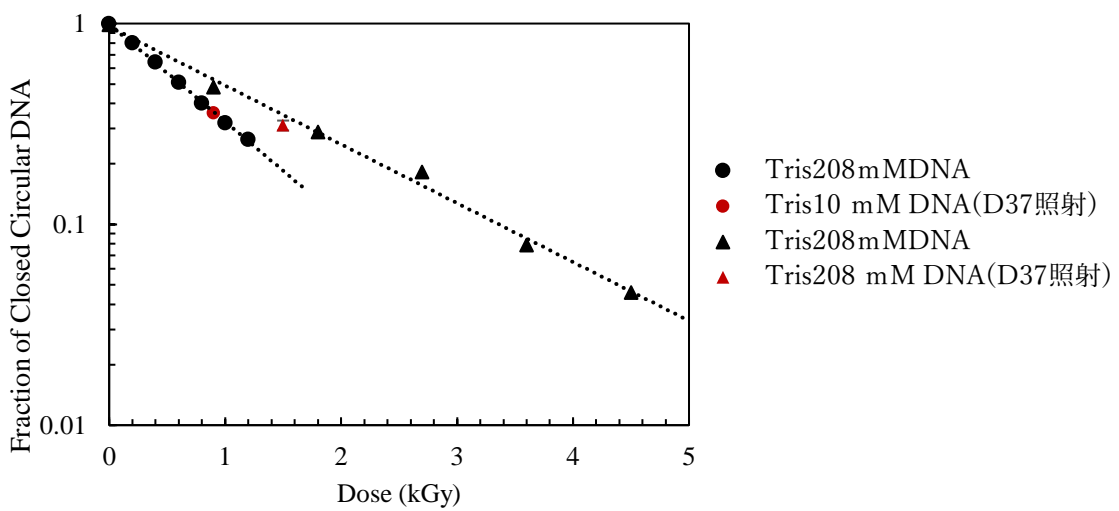


図 2.30 C 線照射プラスミド DNA の Closed Circular form 残存率

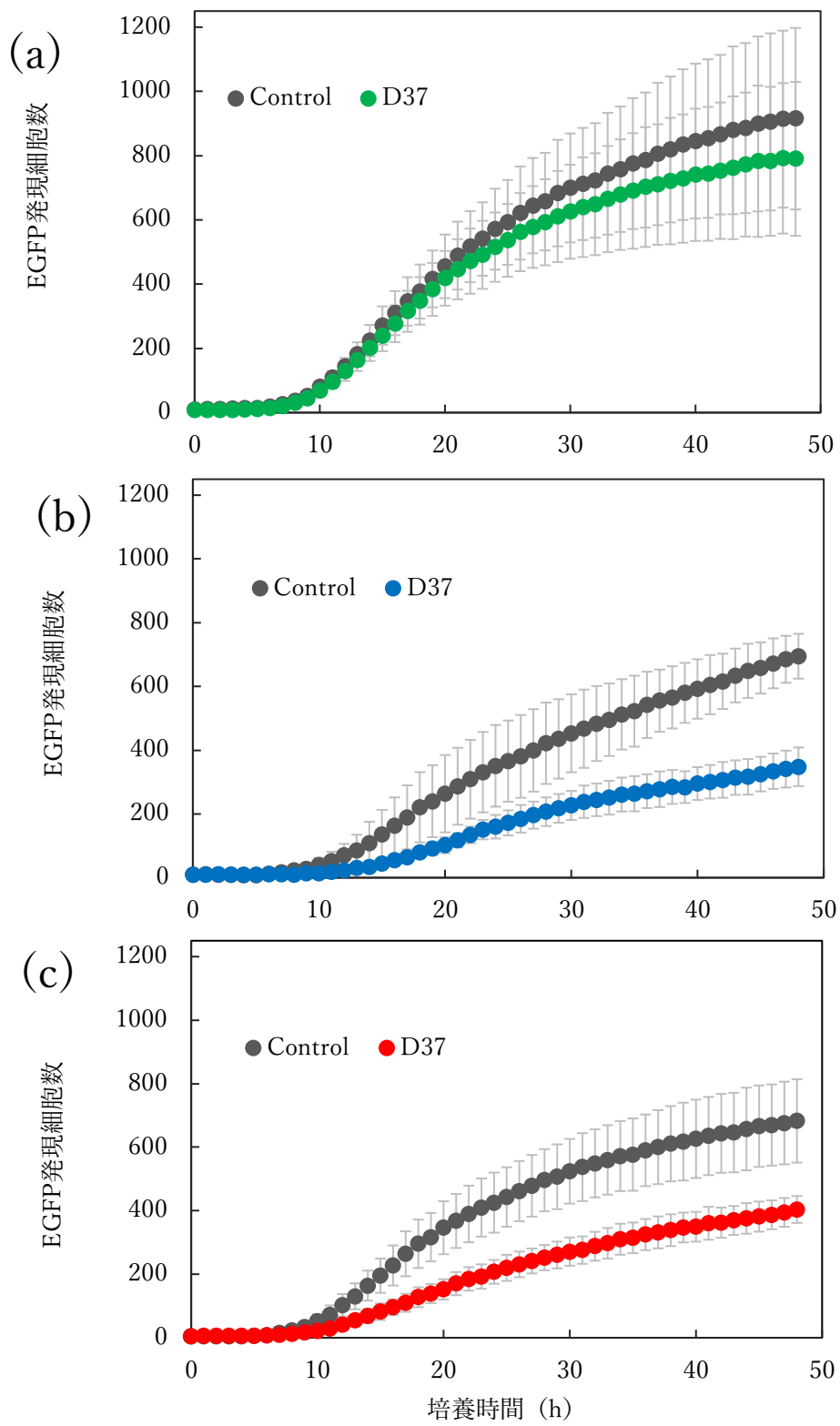


図 2.31 D37 線量の硬 X 線及び C 線を照射した DNA の EGFP 発現細胞数の変化

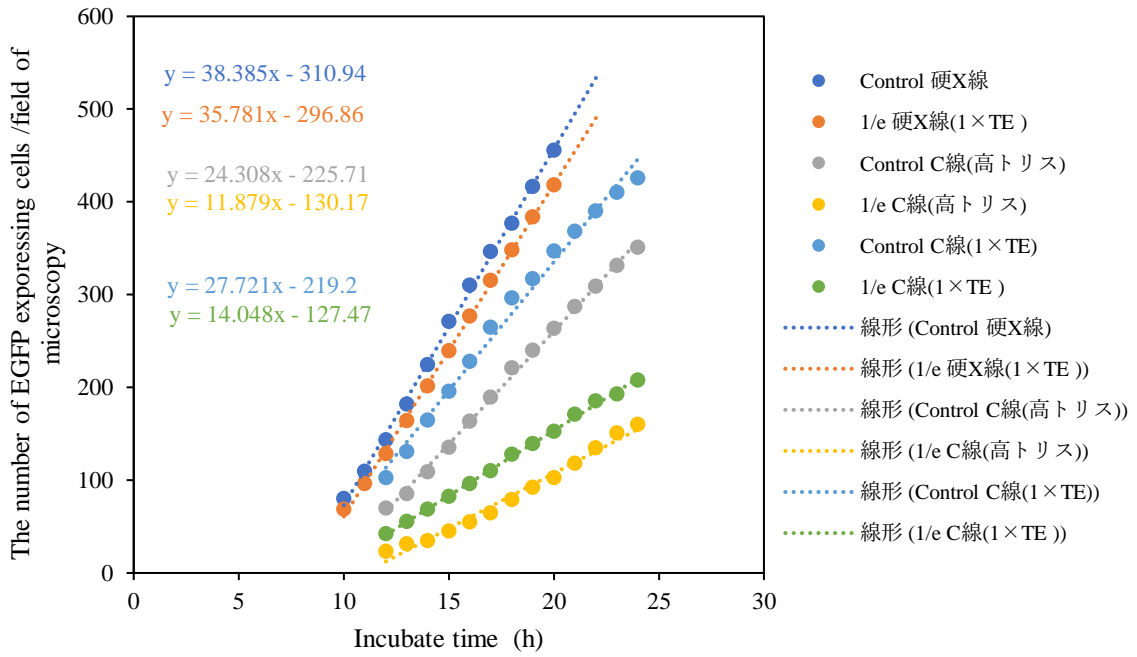


図 2.32 C線照射 DNA 試料の EGFP 発現細胞数の増加

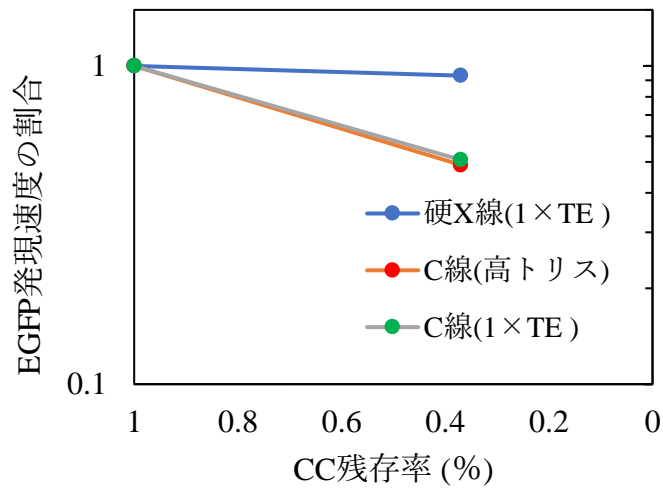


図 2.33 C線の EGFP 発現速度の割合

#### 1.4 考察

第一章では、放射線の線質及び水分子環境の違いがもたらす DNA 損傷に着目し、それらが与える DNA 損傷と修復難易性との関連を検討した。様々な電離放射線を照射した DNA に生じた鎖切断の量を基準とし EGFP 遺伝子発現を比較することで、異なる照射時の試料内水分子環境あるいは異なる線質に依存した DNA 損傷の修復難易性を調べた。

まず、DNA を導入する細胞を同じ組織由来である正常細胞とがん細胞でトランスフェクションに対する応答を比較した。同じ組織由来のがん細胞と正常細胞を比較した実験結果から、MCF-10A では導入した EGFP プラスミド DNA 量に比例して初期培養時間における EGFP 発現速度が上昇した。一方で、MCF-7 では EGFP 発現速度の DNA 量依存性は見られなかった。また、MCF-7 では培養時間が 40 時間を超えても増加し続ける傾向が見られたが、MCF-10A では培養時間 20 時間付近で EGFP 発現細胞数のピークを迎え、その後はゆるやかに減少した。その理由としてトランスフェクションした細胞もしくは細胞外の培地の酸性化がトランスフェクション効率に影響を及ぼしたのではないかと考えられる。ここで使用したリポフェクションは、カチオン性脂質が DNA と複合体を形成し、細胞のエンドサイトーシス機能を介して細胞内へ導入されるトランスフェクション手法である<sup>[35]</sup>。リポフェクションに類似したトランスフェクション法として、カチオン性の水溶性ポリマーである polyethyleneimine (PEI) を基盤とした PEI 法がある。この PEI 法には pH buffering effect と呼ばれる緩衝液の pH 濃度依存性が存在する<sup>[36]</sup>。MCF-7 細胞は外部から酸性物質を導入するなど細胞外の培地の pH 濃度が酸性に傾くことで、トランスフェクション効率が増加することが報告されている<sup>[37,38,39]</sup>。逆に、MCF-10A 細胞は酸性物質の導入でトランスフェクション効率が減少することが同様に報告されている<sup>[37]</sup>。リポフェクションにおいても PEI 法に見られるような pH 濃度による影響が生じたことが示唆された。本研究では、トランスフェクション後の

細胞の培地は細胞を播種してからライブセル観察後の 72 時間の間、培地交換などの操作を行わないため、細胞の代謝によって生産される二酸化炭素や活性酸素により培地が酸性化したことが予測される。細胞及び培地の酸性化が、MCF-10A のトランスフェクションの効率を減少させたために EGFP 発現細胞数のピークを早め、一方で MCF-7 のトランスフェクションの効率を増幅させたために EGFP 発現細胞数が増加し続ける傾向が見られたと考えられる。このように正常細胞かがん細胞かによってトランスフェクション効果の違いが現れることは、大変興味深いと同時に放射線効果を調べる際の実験条件のひとつとして考えてゆくべき因子のひとつであると考えられる。

次に、硬 X 線の照射時の水分子環境の違いがもたらす DNA 修復難易性を、EGFP 発現速度を求めて比較した。結果 1.3.2 の図 2.9 より、EGFP 発現速度は水溶液 > 乾燥薄膜 > 水和薄膜の順に小さくなり、照射時の試料環境の違いにより異なる修復難易性の損傷が誘発されている可能性が示唆された。この原因として、放射線照射によって生成される DNA 損傷の誘発過程が試料環境で異なるため、損傷の DNA 分子上での空間分布が変化することが考えられる。放射線による DNA 損傷の誘発過程は、放射線の DNA への直接のエネルギー付与による直接効果、及び水分子の放射線分解により生じたラジカルが DNA と反応することによる間接効果の二つに区別されるが<sup>[40]</sup>、DNA に緩やかに結合して取り囲む水和水も深く関与している<sup>[27]</sup>。直接効果が生じる場合、トラック構造を反映して DNA 分子へのエネルギー付与が生じるため複数の DNA 損傷がより局在化して誘発し<sup>[2]</sup>、一方で間接効果の場合、放射線による水分子の分解で生じたラジカルはランダムウォークしながら熱的に拡散するため<sup>[41]</sup> DNA 損傷が局在化する確率は小さい。本研究では水溶液、乾燥薄膜、水和薄膜の異なる水環境の DNA 試料を使用しているため、それぞれの試料環境における水分子の放射線分解により生じた活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) の役割について議論する。第一に水溶液の DNA 試料では、バルク水の放射線分解により生

成されたラジカルが、DNA 損傷誘発に寄与すると考えられる。放射線照射によりバルク水の水分子が電離もしくは励起されることで、 $\text{H}_2\text{O}^+$ 、 $\text{e}^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}^*$  (\*は励起状態)、水和電子 ( $\text{e}^-_{\text{aq}}$ )、 $\text{OH}\cdot$  等様々な化学種が生成される<sup>[42]</sup>。その中でも特に反応性が高い  $\text{OH}\cdot$  は、周囲の分子と反応すると同時にラジカル同士が対合することで不對電子状態を解消する。 $\text{OH}\cdot$  の拡散距離はラジカルスカベンジャーが存在する生体環境下では約 6 nm と推定されているため<sup>[43]</sup>、 $\text{OH}\cdot$  が DNA の 6 nm 以内のごく近傍に発生した場合 DNA 損傷を生成する。また、 $\text{OH}\cdot$  よりも遠方まで拡散する化学種として水和電子 ( $\text{e}^-_{\text{aq}}$ ) が挙げられるが、水和電子は反応性が低く DNA 損傷を生成する確率は小さい<sup>[2]</sup>。しかし、熱化し水和電子になる直前の水和前電子 ( $\text{e}^-_{\text{pre}}$ ) は、DNA と反応するエネルギーを持ちその拡散距離は  $\text{OH}\cdot$  よりもわずかに大きい約 10nm 程度である<sup>[44]</sup>。そのためバルク水で生じた  $\text{OH}\cdot$  が局所にクラスター化して反応する確率は低く難修復性の損傷は誘発されにくいと考えられる。第二に水和薄膜の DNA 試料は、バルク水を含まないため、水和水領域の水和水の放射線分解によって生成されたラジカルあるいはイオン化により生じた正孔 (ホール) が損傷誘発に寄与すると考えられる<sup>[17]</sup>。前述したとおり水分子由来のラジカルの反応は約 10nm 程度と非常に拡散距離が小さい。水和水より生じたラジカルは DNA のごく近傍であるため、起点となるイオン化部位の近傍に損傷を誘発しやすくイオン化部位とラジカルの組み合わせによる難修復性の損傷を誘発する可能性がある。第三に乾燥薄膜 DNA 試料は、試料中のバルク水及び水和水はごく少量であるため、放射線が DNA を直接電離するような直接効果による損傷誘発の寄与が最も大きいと考えられる。以上のことから水和水由来のラジカルが損傷誘発に強く寄与することにより、水和薄膜の DNA 試料には水溶液及び乾燥薄膜に比べるとクラスター損傷のような難修復性の損傷が誘発されたことで、EGFP 発現速度が減少したと考えられる。本研究では、DNA 分子周辺の試料環境として水分子に着目して DNA 損傷誘発への影響を検討したが、今後は細胞内に存在

する塩や低分子の有機化合物、タンパク質などの様々な化学物質の存在によって放射線影響がどのように変化するかを検討することで、より実際の生体内反応に近づけることが可能となる。さらに、現段階では細胞にトランスフェクションする DNA 試料としてプラスミド DNA を使用している。しかし実際の細胞内に存在している DNA とはサイズや配列だけでなく、ヒストンタンパク質の有無など構造的に大きく異なっている。細胞内 DNA を模擬したミニクロマチンなどを用いることで、より細胞内に近い条件下での DNA 修復動態の観察が可能となると考えられる。

次に、放射線の線質に依存した DNA 修復難易性を比較するために、DNA トランスフェクション後の培養時間に依存した EGFP 発現細胞数の継時変化の最大勾配を抜き出し、EGFP 発現速度として算出し比較した。放射線の線質によって鎖切断効率が異なるため、それぞれの線質およびエネルギーにおいて  $1/e$  線量を照射し無傷なプラスミド DNA 分画が同程度存在する試料をトランスフェクションした結果を比較した。非照射プラスミド DNA (Control) の EGFP 発現速度を 1 とした時の  $1/e$  線量を照射したプラスミド DNA の EGFP 発現速度の割合を算出した。これにより、放射線の線質に依存した鎖切断効果に左右されずに、照射プラスミド DNA の EGFP 発現速度を DNA 修復難易性として評価可能となる。Ne 線のみ  $1/e$  線量ではなく、ビームタイム上の制約から 500 Gy 照射したときの結果を用いた。縦軸に EGFP 発現速度、横軸に CC 残存率を示した (図 2.34)。



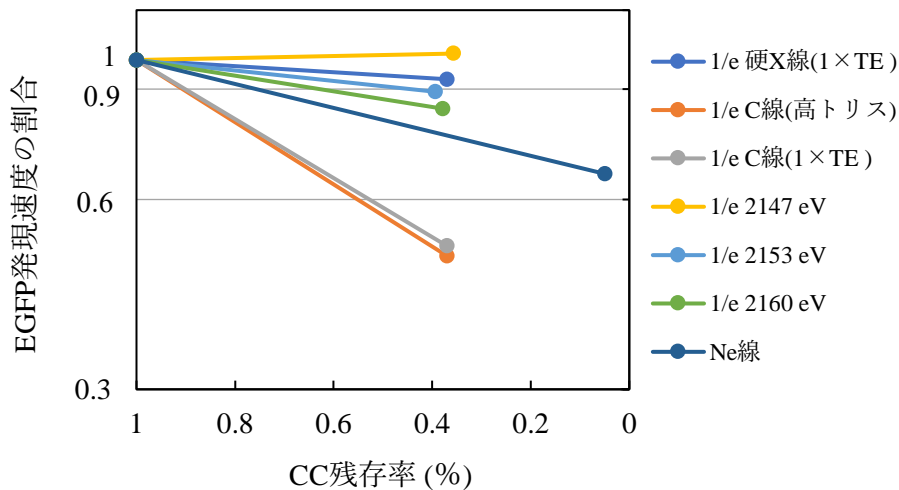


図 2.34 異なる放射線質・エネルギーにおける EGFP 発現速度の CC 残存率依存性

それぞれの放射線の LET は硬 X 線が約 4 keV/μmV、Ne 線が 31 keV/μmV、C 線が 76.9 keV/μmV である。図 2.34 より、Ne 線や C 線などのイオンビームでは硬 X 線や軟 X 線よりも EGFP 発現速度が大きく低下した。特に C 線ではこの影響が顕著であり、高 LET の放射線によってより難修復性の損傷が誘発されていることを示唆している。過去の研究では、高 LET 放射線を DNA に照射した場合に塩基除去修復酵素である Nth や Fpg 処理により検出される塩基損傷がほとんど観測されないことから、高 LET 放射線は DNA に塩基損傷を生成させない、もしくは複雑な DNA 損傷によって修復酵素の機能を阻害しているという 2 つの仮説が考えられてきた<sup>[25,45]</sup>。本研究の結果は、高 LET 放射線により DNA 修復酵素が修復できないような複雑なクラスター損傷が生成している可能性が示されたことで、後者の仮説を改めて強く裏付ける結果となった。また、リンの K 殻共鳴ピークエネルギー (2153 eV) 及び、その前後の単色 X 線を比較すると、2147eV よりも 2153 および 2160 eV ではわずかに EGFP 発現速度が低下し、リンの K 殻共鳴光電効果によりの影響が示唆された。また、2147eV の単色 X 線を照射した結果は、CC 残存率が約 37%に減少したにも関わらず EGFP 発現

速度は Control よりも上昇した。この原因としてトランスフェクション実験が細胞分裂の速度及び、細胞播種時の細胞数に強く影響されることが考えられる。さらに、これまでの研究からトランスフェクション効率には MCF-7 細胞のパッセージ数に強く依存される可能性がある（データは示していない）。EGFP 発現効率、またその発現細胞数の増加については究明すべき点が多く、今後、修復された DNA による EGFP 発現を「EGFP 修復効率」として、損傷の入っていない DNA による EGFP 発現を「トランスフェクション効率」としてそれぞれ独立して評価可能となるふたつの蛍光タンパク質を持つプラスミドベクター系の開発が必要である。

以上のことから本研究では、実験的に未解明だった放射線による DNA 損傷の修復難易性を、プラスミド DNA を用いることで可視的に評価することが可能であることが示された。EGFP 発現速度の低下には硬 X 線や軟 X 線による DNA 分子骨格のリン K 殻共鳴励起以上に LET の高さが難修復性損傷誘発に寄与することが示された。特に、高 LET 放射線による難修復性の DNA 損傷（クラスター損傷）の存在を実験的に実証したのは本研究が初めてである。

## 第二章

# 細胞内における線状化 DNA の 細胞内遺伝子発現の低減

## 2.1 背景と目的

近年の生命科学において、遺伝子操作や目的タンパク質の発現を目的として外因性の DNA などの核酸分子を細胞内へ導入（トランスフェクション）することは非常に重要な技術となりつつある。特に、プラスミド DNA の細胞内導入には、安全性が高く、特別な装置や高度な技術が必要とされないトランスフェクション法として、非ウイルス性ベクターを用いたトランスフェクション試薬が使用される。しかし、非増殖細胞へのトランスフェクション効果がないことや、トランスフェクション後の細胞内のプラスミド DNA の挙動など実験的に明らかになっていないことが多い。本研究では化学的にプラスミド DNA を細胞内にトランスフェクションさせるリポフェクション法を利用している。細胞膜はタンパク質が埋め込まれたリン脂質二重膜で構成されており、リン酸基部分が負電荷を帯びている（アニオン性）。また、水溶液中の DNA も、これを構成している主成分であるリン酸が水素イオン ( $H^+$ ) を電離していることで、負電荷に帯電している。従って、アニオン性である細胞膜は通常、同じくアニオン性の比較的大きな分子である DNA や RNA を通過させないためのバリアとして働いている。リポフェクション法では、負電荷の DNA を、陽電荷に帯電した（カチオン性）人工リポソームで包み込むことで DNA の複合体を形成し化学的に電荷修飾し、細胞内へと導入させる手法である。これにより細胞内にトランスフェクトされた DNA は、エンドサイトーシスを介してエンドソームに組み込まれ、エンドソームの破裂時にサイトゾルにさらされ、DNA センサー分子によって検出される<sup>[1,2]</sup>。さらに近年の研究では、サイトゾルにさらされたプラスミド DNA が最終的に核膜内へと取り込まれることで遺伝子発現することが報告されている<sup>[3]</sup>。環状のプラスミド DNA に比べ直鎖上のプラスミド DNA は、DNA エキソヌクレアーゼによって分解されやすいと考えられている<sup>[4,5]</sup>。リポソームと環状 DNA の複合体はコンパクトな球形または円筒形の構造であり、リポソームと直鎖上 DNA の複合体はパールネック構造であることが、AFM を用いた観察によって明らかにされている<sup>[4]</sup>。

コンパクトな環状 DNA 複合体に対して、直鎖状 DNA 複合体はエンドサイトーシスによって取り込まれにくく、トランスフェクション効率が著しく低下することが報告されている<sup>[6]</sup>。しかしその詳細は未解明な部分が多い。

放射線のヒット理論よりプラスミド DNA 分子に SSB が生じる事象はランダム事象であり、ポワソン分布に従うとされる。1 章の結果より 1.2 kGy の硬 X 線を照射したプラスミド DNA や、2.0 kGy の Ne 線を照射したプラスミド DNA はいずれもインタクトな DNA である Closed Circular Form のプラスミド DNA がほとんど残っていないことはアガロースゲル電気泳動の結果から明らかになっている。すなわち、それぞれの照射 DNA をヒト乳がん細胞 MCF-7 にトランスフェクションした後に観察された EGFP 遺伝子発現細胞は、SSB がランダムで生じた Open Circular form もしくは 10 塩基以内に複数の SSB が誘発されたことで DSB が生じた Linear form のプラスミド DNA 由来である。プラスミド DNA のコンフォメーションに依存したトランスフェクションの効率をそれぞれ定量化することで、放射線照射により誘発されたプラスミド DNA 鎖切断の収率と吸収線量に依存した蛍光タンパク質発現遺伝子の低下を放射線による DNA の修復難易性として評価することが可能になる。

本研究は、酵素処理することでプラスミド DNA に人為的に SSB 及び DSB を導入し、コンフォメーションに依存したトランスフェクション効率を定量化した。この時、不完全な酵素処理によって切れ残るプラスミド DNA による蛍光タンパク質発現を検討した。さらに Linear DNA に着目して認識配列が異なる複数の制限酵素でそれぞれ処理し、“モデル DSB”を作成し、トランスフェクション後の遺伝子発現に対するサイト依存性を評価した。

## 2.2 材料と方法

プラスミド DNA にニッキング酵素を用いて二つの一本鎖切断 (SSB) を導入し、Closed Circular (CC) Form から Open Circular (OC) Form へ、制限酵素を用いて二本鎖切断 (DSB) を導入して Linear (L) Form へと酵素的に形態を変化させた。さらにモデル DNA それぞれの酵素のプラスミド DNA 上の認識部位は、EGFP コード配列の下流もしくは上流にある (図 3.1)。また、OC を導入するためのニッキング酵素 Nb.BsmI はプラスミドの異なる鎖に 2 つのニッキングサイトを持ち、それぞれの間隔は約 100 bp (1,500~1,505 bp および 1,599~1,604 bp) 離れている。ニックが DSB となるためには、2 つの SSB 間隔が 9 bp 以下である必要があるため、DSB は導入されないと判断した<sup>[7]</sup>。さらに一般的に細胞内に取り込まれにくいと考えられている直鎖状 DNA について着目してトランスフェクションに対する応答を調べた。認識部位の異なる制限酵素を用いて、EGFP 遺伝子と制限酵素による DSB の位置を変えた Linear プラスミド DNA 試料を作成した (図 3.1)。これを“モデル DSB”として細胞へトランスフェクションし、直鎖状のプラスミド DNA の EGFP 遺伝子のサイト依存性を調べた。

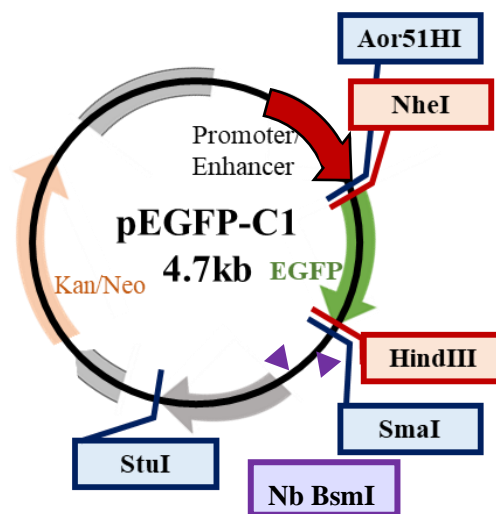


図 3.1 プラスミド DNA (pEGFP-C1) 上の酵素の認識部位

## 2.2.1 プラスミド DNA への酵素処理

### 2.2.1.1 ニッキング酵素処理

Nb.BsmI (Nb.BsmI, R0706S, New England Biolabs Japan)

プラスミド DNA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 1  $\times$  TE buffer 溶液) 1  $\mu\text{g}$  あたり、1  $\mu\text{l}$  の Nb.BsmI、5  $\mu\text{l}$  の NE buffer3.1 (NE Buffer r3.1, B7203S, New England Biolabs Japan)、全量 50 $\mu\text{l}$  まで 1  $\times$  TE バッファーを加えて、65 $^{\circ}\text{C}$  に調節したヒートブロックで 30 分間インキュベートした。

### 2.2.1.2 制限酵素処理

#### 1. スティッキーエンド酵素

HindIII (HindIII-HF, R3104S, New England Biolabs Japan)

プラスミド DNA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 1  $\times$  TE buffer 溶液) 1 $\mu\text{g}$  あたり、1 $\mu\text{l}$  の HindIII-HF、5  $\mu\text{l}$  の Cutsmart、全量 50 $\mu\text{l}$  まで 1  $\times$  TE バッファーを加えて、37 $^{\circ}\text{C}$  に調節したヒートブロックで 30 分間インキュベートした。

NheI (NheI-HF, R3104S, New England Biolabs Japan)

プラスミド DNA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 1  $\times$  TE buffer 溶液) 1 $\mu\text{g}$  あたり、1 $\mu\text{l}$  の NheI-HF、5  $\mu\text{l}$  の Cutsmart、全量 50 $\mu\text{l}$  まで 1  $\times$  TE バッファーを加えて、37 $^{\circ}\text{C}$  に調節したヒートブロックで 30 分間インキュベートした。

#### 2. bluntエンド酵素

SmaI (Sma-I, 1085A, Takara Bio inc.)

プラスミド DNA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 1  $\times$  TE buffer 溶液) 1 $\mu\text{g}$  あたり、1 $\mu\text{l}$  の Sma-I、2  $\mu\text{l}$  の 10  $\times$  T Buffer、2  $\mu\text{l}$  の 0.1% BSA、全量 20 $\mu\text{l}$  まで 1  $\times$  TE バッファーを加えて、30 $^{\circ}\text{C}$  に調節したヒートブロックで 30 分間インキュベートした。

Aor51HI (Eco47 III) (Aor51HI (Eco47 III), 1118A, Takara Bio inc.)

プラスミド DNA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 1  $\times$  TE buffer 溶液) 1 $\mu\text{g}$  あたり、1 $\mu\text{l}$ の Aor51HI、2  $\mu\text{l}$ の 10  $\times$  M Buffer、全量 20 $\mu\text{l}$ まで 1  $\times$  TE バッファーを加えて、37 $^{\circ}\text{C}$ に調節したヒートブロックで 30 分間インキュベートした。

StuI (Stu-I, 1088A, Takara Bio inc.)

プラスミド DNA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 1  $\times$  TE buffer 溶液) 1 $\mu\text{g}$  あたり、1 $\mu\text{l}$ の Stu-I、2  $\mu\text{l}$ の 10  $\times$  M Buffer、全量 20 $\mu\text{l}$ まで 1  $\times$  TE バッファーを加えて、37 $^{\circ}\text{C}$ に調節したヒートブロックで 30 分間インキュベートした。



## 2.2.2 酵素処理したプラスミド DNA からの Linear DNA 抽出

制限酵素やニックング酵素で処理したプラスミド DNA の中で、アガロースゲル電気泳動ゲルの積分強度解析では検出されないレベルの酵素未処理のプラスミド DNA が残存する可能性がある。制限酵素で処理したプラスミド DNA を細胞にトランスフェクションする際に、切れ残りの DNA が EGFP 遺伝子発現にどの程度の影響を与えるのか検討した。制限酵素 HindIII で処理したプラスミド DNA をアガロースゲルで電気泳動した後に、ゲルをエチジウムブロマイド染色した。この時のアガロースゲル電気泳動法とゲル染色法は材料と方法 1.2.2 と同様の操作である。このアガロースゲルを LED トランスイルミネーター（ゲルみえーる, 和光純薬工業株式会社）を用いて DNA バンドを可視化させ、ゲルバンドカッター（Agarose Gel Band Cutter, FG-830, 日本ジェネティクス株式会社）で素早く Linear DNA バンドをゲルから切り出し、エッペンチューブに移した。DNA リカバリーキット（Zymoclean Gel DNA Recovery Kit, D4008, フナコシ）を用いて Linear DNA をゲルから精製した。電子天秤（電磁式はかり, 研精工業株式会社）で切り出したアガロースゲルの重さを測り、アガロースゲル 100 mg あたり 300  $\mu$ l の ADB（ADB, D4001-1-100, フナコシ）を加えた。55  $^{\circ}$ C に設定したヒートブロックでアガロースゲルを溶かした溶液を抽出用のスピncラム（Zymo-Spin Column I, C1003-50, フナコシ）に移し、1 分間 15000rpm で遠心分離した。廃液を捨て、DNA Wash Buffer（DNA Wash Buffer, D4003-2-24, フナコシ）を 200  $\mu$ l 添加しリンスした。遠心分離した後、スピncラムをエッペンチューブに設置し、DNA Elution Buffer（DNA Elution Buffer, D3004-4-4, フナコシ）を滴下し遠心分離によって DNA を抽出した。この DNA 溶液をエタノール沈殿して精製し、分光光度計もしくは微量分光光度計にて濃度測定した。DNA の濃度がリポフェクションに適した濃度 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l $\sim$ 5.0  $\mu$ g/ $\mu$ l を下回る場合、もう一度エタノール沈殿した。

### 2.2.3 酵素処理したプラスミド DNA の非照射細胞への導入と観察

酵素処理したプラスミド DNA をヒト乳がん細胞である MCF-7 へトランスフェクションした。これは 1 章の「1.2 材料と方法」の「1.2.4 トランスフェクション」、「1.2.5 タイムラプス撮影」、「1.2.6 蛍光顕微鏡撮影写真の解析」と同様の操作を行った。

### 2.2.4 EGFP 遺伝子の細胞内ゲノムへの導入

プラスミド DNA を細胞にトランスフェクションした際に、細胞のゲノム DNA にプラスミド DNA が組み込まれることで EGFP 遺伝子を恒常的に発現する可能性を検討した。トランスフェクション後 96well ディッシュで 48 時間経過した細胞を回収し、12well ディッシュに播種しその後 7 日間培養した (図 3.2)。ゲノム導入効率に対するコンフォーメーション依存性を調べるために、Closed Circular のプラスミド DNA と Linear のプラスミド DNA を使用した。これは材料と方法 2.2.2 で記載している Linear DNA のみ含まれているプラスミド DNA 試料であり、酵素処理したプラスミド DNA をアガロース電気泳動し、ゲルから Linear DNA のバンドのみを切り出したため、CC プラスミド DNA は残存していないと考えられる。トランスフェクション後 96well ディッシュで 48 時間経過した時と、12well ディッシュに播種しなおし 7 日間培養した時に蛍光顕微鏡撮影し、EGFP 発現細胞数および恒常的に EGFP 遺伝子発現の機能を有したクローン細胞集団が存在しているか調べた。

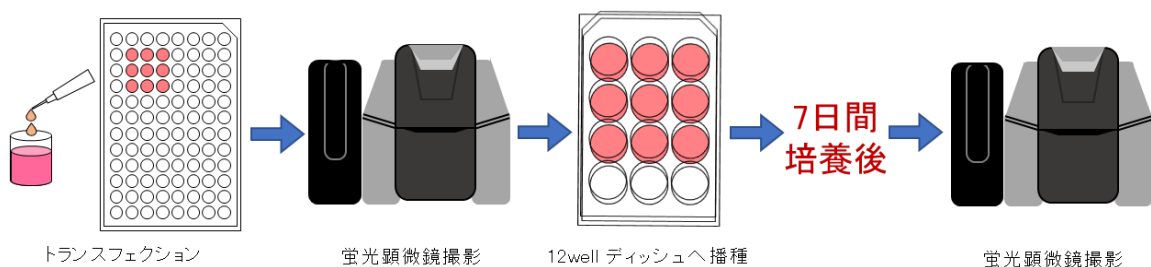


図 3.2 クローニング細胞検討のためのトランスフェクション実験概要図

## 2.3 結果

### 2.3.1. 不完全な酵素処理による切れ残りプラスミド DNA の検討

制限酵素で処理したプラスミド DNA を細胞にトランスフェクションする際に、切れ残りの DNA が EGFP 遺伝子発現にどの程度の影響を与えるのか検討した。制限酵素 HindIII 処理 DNA を電気泳動したアガロースゲルから Linear form DNA のみを抽出したプラスミド DNA と酵素未処理のインタクトなプラスミド DNA を MCF-7 へトランスフェクションした。さらに、切れ残りを検討するための比較 DNA 試料として制限酵素 HindIII 処理のみを行ったプラスミド DNA をトランスフェクションした。EGFP 発現細胞数を培養時間ごとにカウントした結果を図 4.1 にプロットした。図 4.1 より、Linear form DNA のみを抽出した DNA と HindIII 処理のみを行った DNA の二つの EGFP 発現細胞数を比較したところ、どちらもコントロールに対して 2 割程度であり、有意な差は見られなかった。これはプラスミド DNA を酵素処理した際に生じる切れ残りのプラスミド DNA の量が非常に少なく、DNA の修復応答の指標として観察する EGFP 発現細胞数に大きな影響を与えないことが示された。酵素処理の切れ残りによる影響がわずかであることから、様々な制限酵素を用いたモデル DSB のプラスミド DNA 試料は、酵素処理のみを行って作成した。

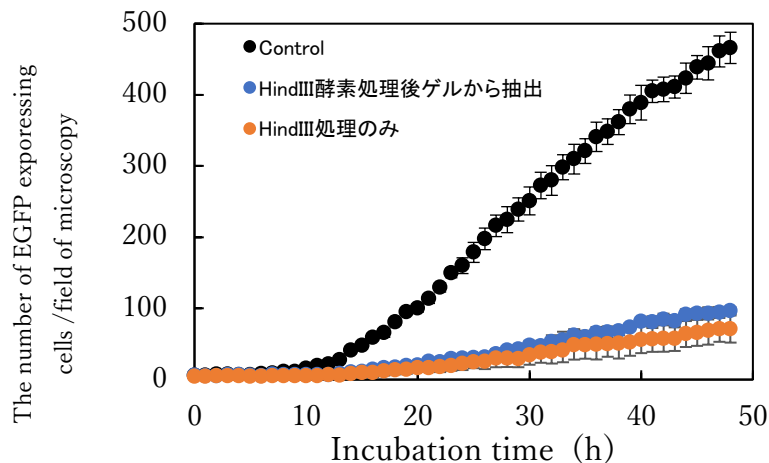


図 4.1 不完全な酵素処理による切れ残りプラスミド DNA の検討結果

### 2.3.2. 酵素処理プラスミド DNA の形質転換効率

コンフォメーションの異なるプラスミド DNA のそれぞれのトランスフェクション効率を定量するために、制限酵素 HindIII 及びニッキング酵素 Nb BsmI 処理したプラスミド DNA を MCF-7 へ導入した。EGFP 発現細胞数を培養時間ごとにカウントした結果を図 4.2 にプロットした。図 4.2 より、各コンフォメーションのプラスミド DNA を導入した細胞の EGFP 発現細胞数を比較すると、Closed Circular-form の EGFP 発現細胞率に対して Open Circular-form では 48 時間時点において約 88.2%、Linear-form では約 15.9%であった。

次に、認識部位の異なる制限酵素を用いて、EGFP 遺伝子と制限酵素による DSB の位置を変えた“モデル DSB”の EGFP 遺伝子のサイト依存性を調べた。プラスミド DNA を切断端が突出末端になるスティッキーエンド酵素 HindIII 及び NheI、切断端が平滑末端になる blunt エンド酵素 SmaI、Aor51HI 及び StuI を用いて処理した。それらの酵素処理プラスミド DNA を MCF-7 へトランスフェクションし、EGFP 発現細胞数を培養時間ごとにカウントした結果を図 4.3 にプロットした。スティッキーエンド酵素のトランスフェクション効率は 48 時間時点においてコントロールに対して約 40%だった。また、blunt エンド酵素の Aor51HI と SmaI も同等の値を示した。これにより、切断端の構造はトランスフェクション効率に寄与しないことが示された。また、NheI と Aor51HI 処理した試料に関しては EGFP 遺伝子とプロモーター遺伝子を切断しているにもかかわらず、そのトランスフェクション効率は HindIII や SmaI 処理した DNA と有意な差が見られなかった。さらに EGFP 遺伝子と 1000bp 以上離れた所に制限酵素の認識配列を持つ StuI 試料では、EGFP 遺伝子の近傍に認識配列を持つ他の酵素よりも約 2 倍高いトランスフェクション効率を示した。

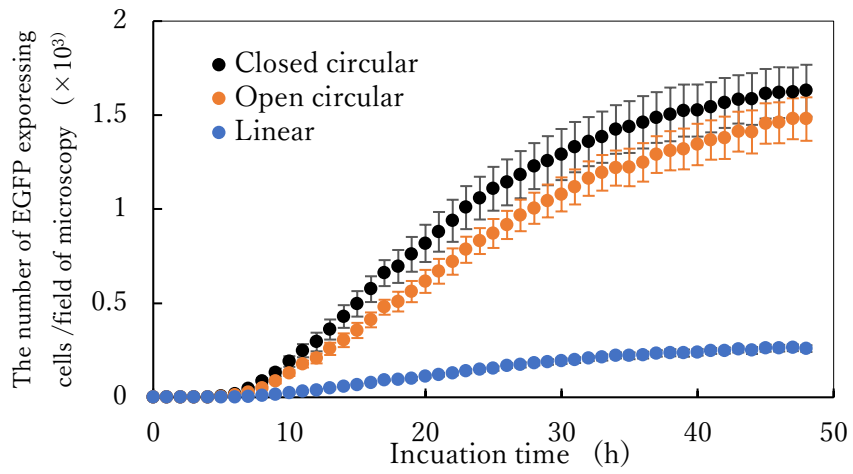


図 4.2 不完全な酵素処理による切れ残りプラスミド DNA の検討結果

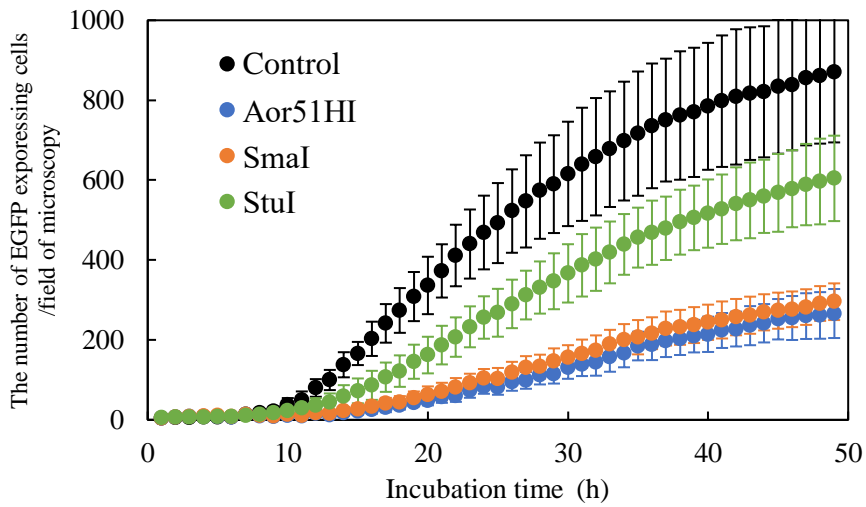
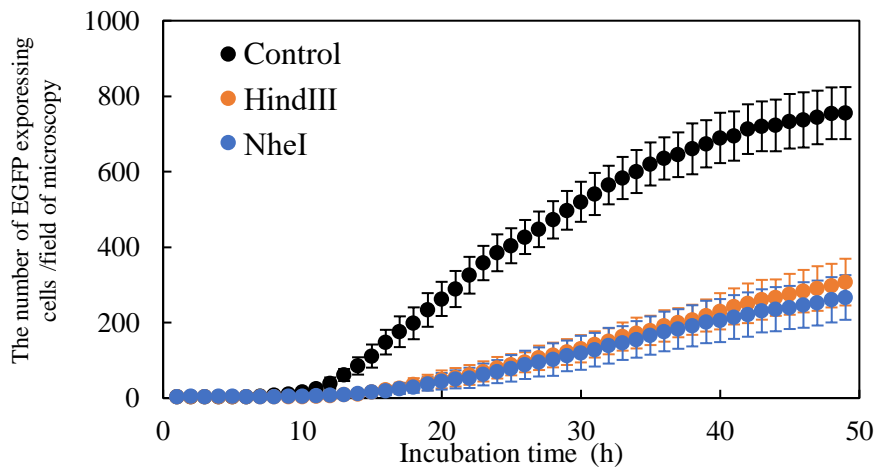


図 4.3 モデル DSB DNA の導入後の EGFP 発現細胞数の変化

### 2.3.3. EGFP 発現細胞のクローニングとプラスミド DNA の細胞内ゲノム導入効率

プラスミド DNA を細胞にトランスフェクションした際に、細胞のゲノム DNA にプラスミド DNA が組み込まれることで EGFP 遺伝子を恒常的に発現する可能性を検討した。トランスフェクション後 48 時間観察時点の 96well ディッシュの EGFP 発現細胞の蛍光写真を図 4.4 に、12well ディッシュに播種して 7 日間培養した蛍光写真を図 4.5 と図 4.6 に示す。図 4.5 から Closed Circular のプラスミド DNA をトランスフェクションした細胞の中で、隣り合う複数の細胞で EGFP を発現する細胞集団を確認（図中に点線でマーク）した。トランスフェクション後 96well ディッシュで 48 時間経過した時と、播種した後 7 日間培養した時のそれぞれの EGFP 発現細胞数、および複数の細胞で EGFP 発現細胞集団（EGFP クローン細胞集団）の数を計測した。また、トランスフェクション後 96well ディッシュで 48 時間培養後の EGFP 発現細胞数に対する EGFP クローン細胞集団数の割合をクローニング効率として算出した（表 2.5）。EGFP クローン細胞集団の定義として、1 つの EGFP 発現細胞が 3 回以上の細胞分裂を繰り返すことで 8 個 ( $1 \times 2^3$ ) 以上の細胞集団へと成長したものを計数した。Closed Circular のプラスミド DNA のクローニング効率は約 2.2% で、Linear のプラスミド DNA では約 0.2% だった。

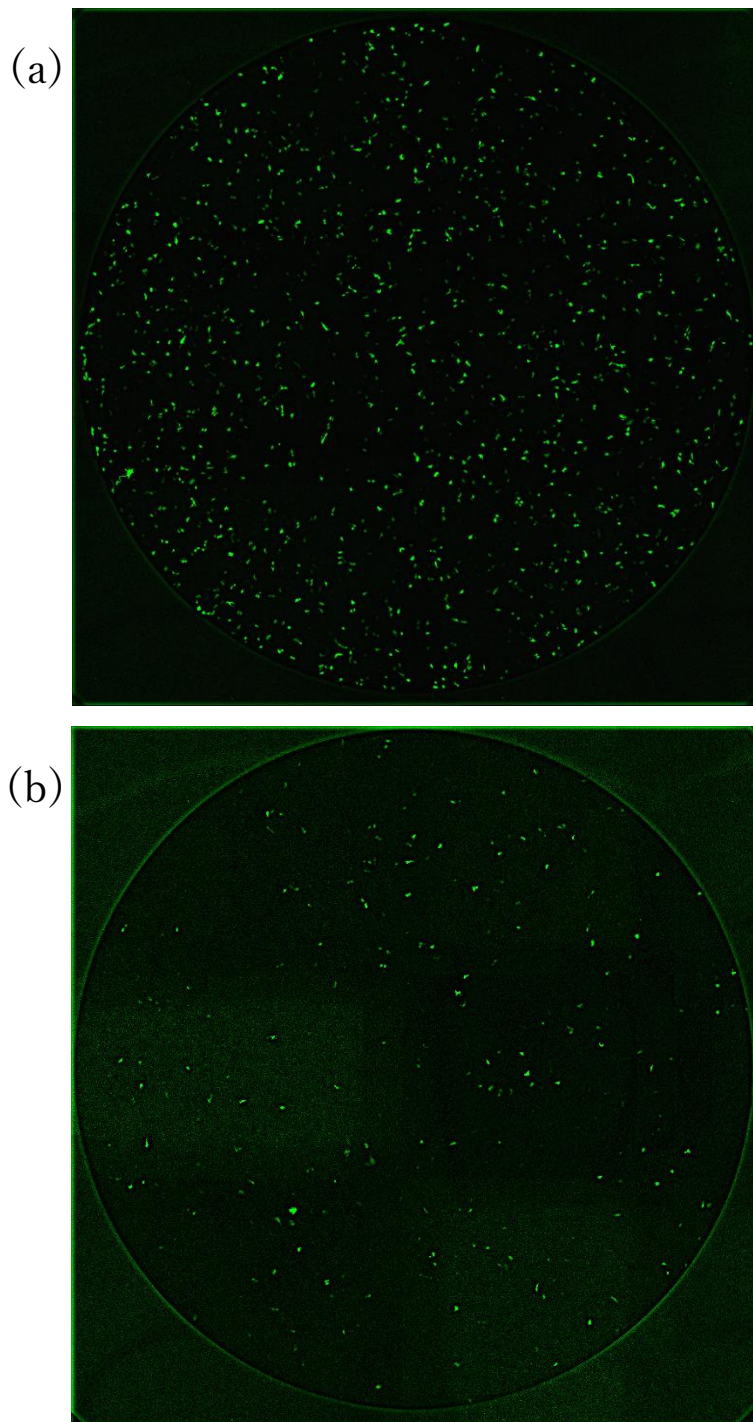


図 4.4 トランスフェクションした後 48 時間時点の EGFP 蛍光像  
(a) 96well ディッシュに播種した MCF-7 へ 0.2 $\mu$ g の Closed Circular DNA をトランスフェクションし、48 時間培養後の蛍光写真を示す。(b) 96well ディッシュに播種した MCF-7 へ 0.2 $\mu$ g の Linear DNA をトランスフェクションし、48 時間培養後の蛍光写真を示す。



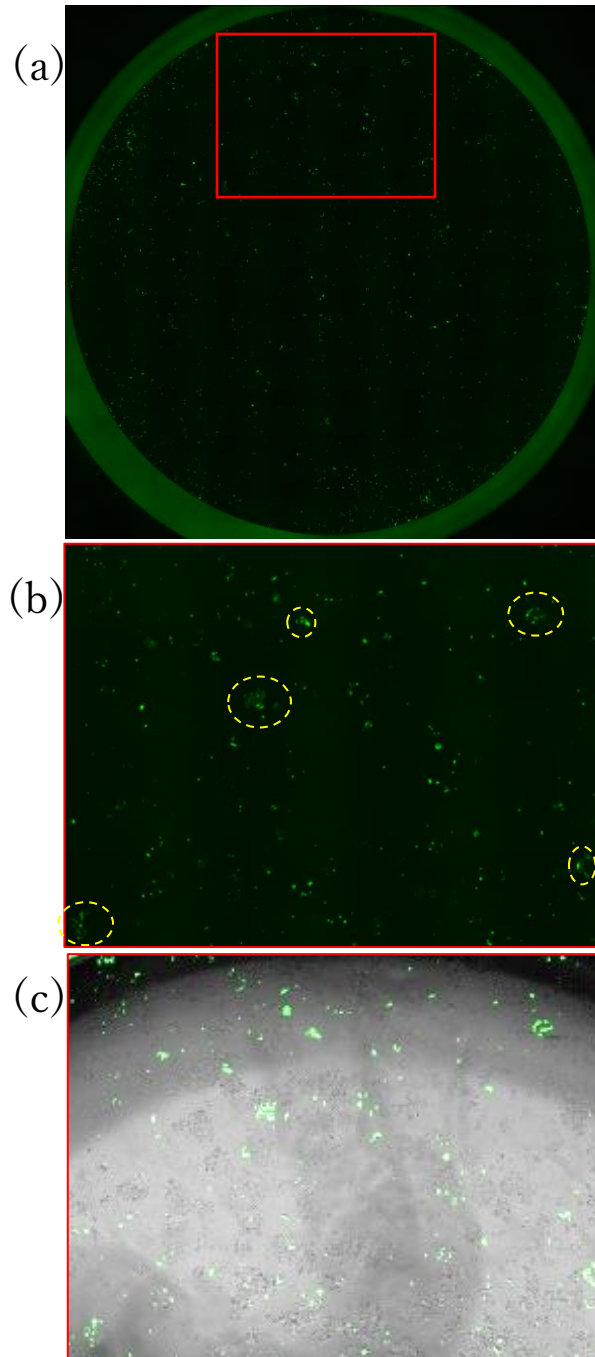


図 4.5 Closed Circular DNA 導入細胞播種後 7 日間培養時点の EGFP 蛍光像

(a) 12well ディッシュへ Closed Circular DNA をトランスフェクションした MCF-7細胞を播種し、7 日間培養した蛍光写真を示す。(b) (a) の写真上に赤枠で示した範囲を拡大した蛍光像を示す。黄色の点線で EGFP 発現細胞が分裂したと判断した EGFP クローン細胞集団を示す。(c) (a) の写真上に赤枠で示した範囲を拡大した蛍光像と位相差像をマージした像を示す。



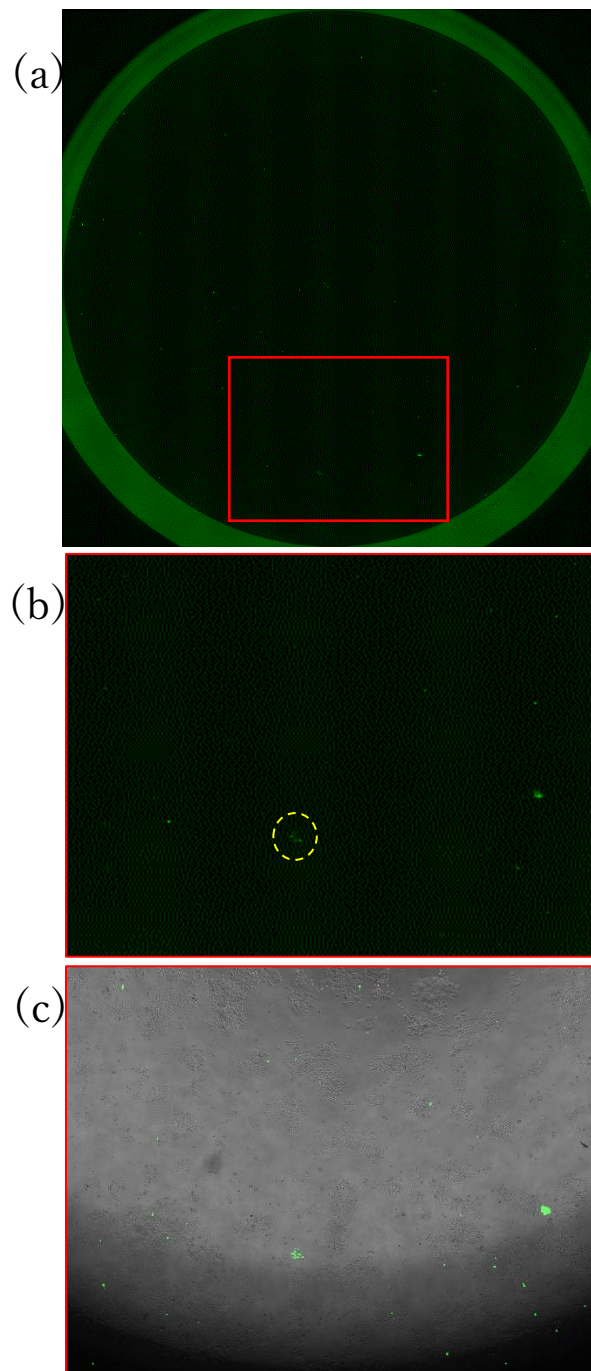


図 4.6 Linear DNA 導入細胞播種後 7 日間培養時点の EGFP 蛍光像

(a) 12well ディッシュへ Linear DNA をトランスフェクションした細胞を播種し、7 日間培養時点の蛍光写真を示す。(b) (a) の写真上に赤枠で示した範囲を拡大した蛍光像を示す。黄色の点線で EGFP 発現細胞が分裂したと判断した EGFP クローン細胞集団を示した。(c) (a) の写真上に赤枠で示した範囲を拡大した蛍光像と位相差像をマージした像を示す。

表 2.5 EGFP 発現細胞数及びとクローニング細胞集団数とクローニング効率

プラスミド DNA の コンフォメーション	EGFP 発現細胞数 48 時間培養後 (96well)	EGFP 発現細胞数 7 日間培養後 (12well)	
Closed Circular form	931 (±191.0)	2012 (±307.2)	
Linear form	194 (±68.7)	260 (±14.4)	
プラスミド DNA の コンフォメーション	クローン集団数 48 時間培養後 (96well)	クローン集団数 7 日間培養後 (12well)	クローニング効率
Closed Circular form	0 (±0)	20.7 (±4.8)	2.2%
Linear form	0 (±0)	0.3 (±0.47)	0.2%

#### 2.3.4. 予測値の算出と比較

前述の結果からプラスミド DNA の各コンフォメーションにおけるトランスフェクションの効率が得られた。これらの結果を、放射線を照射して鎖切断の生じたプラスミド DNA のコンフォメーション構成比に加重平均させる。これにより放射線を照射したプラスミド DNA の EGFP 発現に対して、その時の照射プラスミド DNA と同じコンフォメーション構成比の時の EGFP 発現「予測値」を算出する。

##### 2.3.4.1. 放射線照射による DNA 損傷の定量

本研究において放射線照射によってプラスミドに鎖切断 (SSB) が誘発される事象は、放射線のヒット理論よりランダム事象であり、ポワソン分布に従うと仮定される。定数  $\lambda > 0$  に対し、自然数を値にとる確率変数  $X$  が式 (2-1) を満たすとき、確率変数  $X$  はパラメータ  $\lambda$  のポワソン分布に従う。 $P(X)$  は、 $X$  の数の SSB がプラスミド分子で生成された時の確率であり、 $\lambda$  とはプラスミド全体で生成される SSB の平均数である。

$$P(k) = \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{k!} \cdot \cdot \cdot (2-1)$$

式 (2-1) より、プラスミド DNA における Closed Circular 残存率 (CC 残存率)  $Y$  は DNA 上に鎖切断が全く生じない確率、式 (2-2) で表すことができる。CC の残存率は指数関数的に減少し、最小二乗法により求めた指数近似曲線の式は式 (2-3) で表される。ここで、 $e$  の指数は吸収線量  $D$  に比例し、その比例定数は  $-k$  である。式 (2-3) の  $k$  の値から  $P = e^{-1} \doteq 0.37$  となる線量  $D_{37}$  を求めた。

$$Y = P(0) = \frac{\lambda^0 e^{-\lambda}}{0!} = e^{-\lambda} \cdot \cdot \cdot (2-2)$$

$$Y = a e^{-kD} \cdot \cdot \cdot (2-3)$$

硬 X 線の  $1/e$  を与える  $D_{37}$  は 0.252 kGy だった。これはプラスミドに平均 1 ヒットを与える線量であり、各吸収線量を  $D_{37}$  の値で除することで、平均 SSB 数である  $\lambda$  を

求めることが出来る。各吸収線量における  $\lambda$  を式 (2-1) に代入し、それぞれの線量での SSB 生成数 1~10 までの確率を算出し、SSB 生成頻度を図 4.7 に示した。

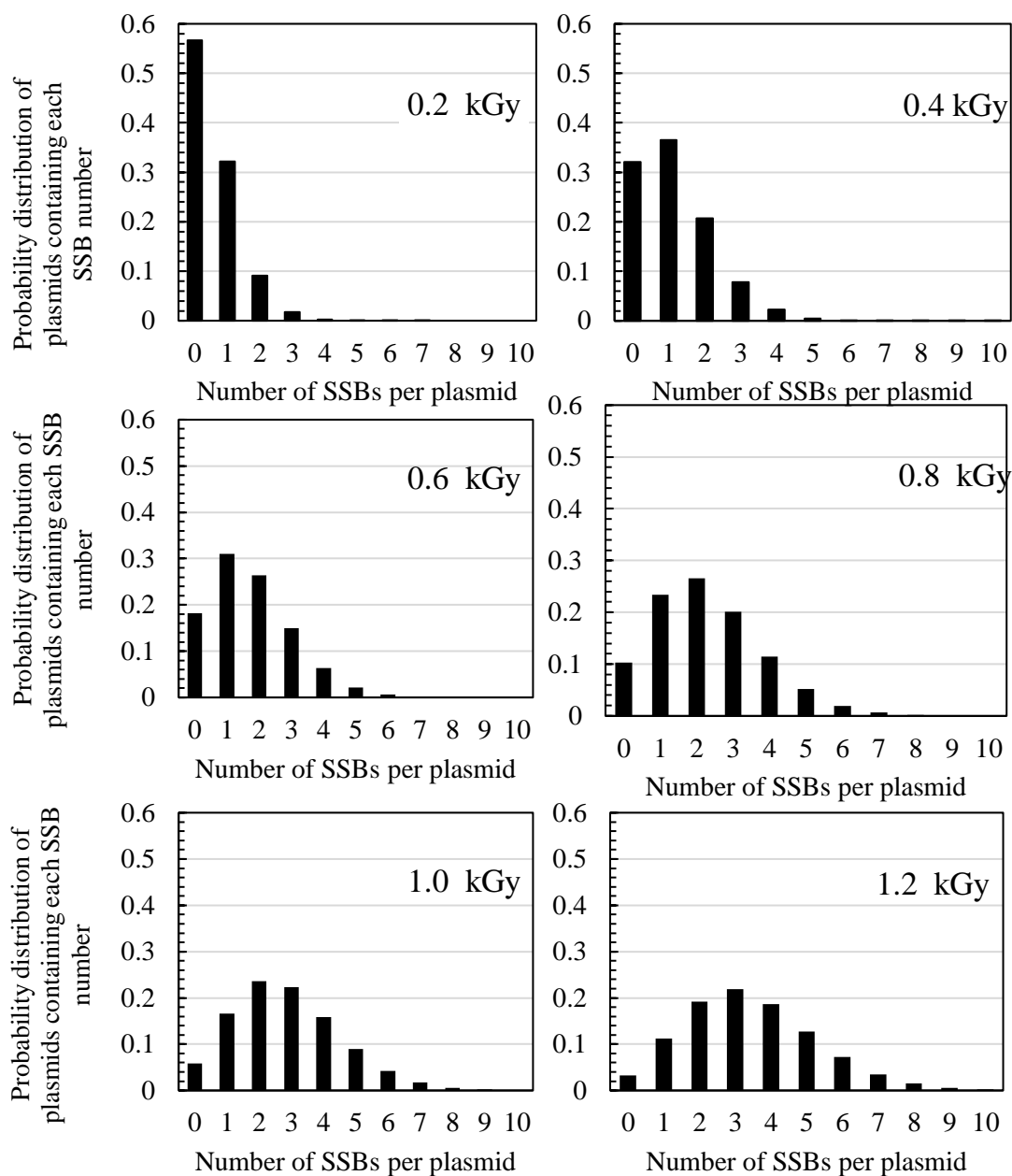


図 4.7 各吸収線量における SSB 生成頻度

各放射線量での SSB のポアソン分布を仮定して計算した、pEGFP-C1 プラスミド分子あたりの SSB 数の分布を示す。

#### 2.3.4.2. X線照射プラスミド DNA コンフォメーション構成比による EGFP 発現細胞数の 予測値算出

ある放射線を照射した時のコンフォメーション構成比を、CC が  $\alpha$ 、OC が  $\beta$ 、L が  $\gamma$  だとする。また各コンフォメーションをトランスフェクションした場合の t 時間後の一視野あたりの EGFP 発現細胞数を  $N_{CC(t)}$ 、 $N_{OC(t)}$ 、 $N_L(t)$ 、とする。それぞれのパラメータ N について、予測値の算出に利用するために理想的な条件として算出する。

始めに、 $N_{CC(t)}$  について議論した。Control のプラスミド DNA には Closed Circular-form (CC) のプラスミド DNA の他にも Open Circular-form (OC) のプラスミド DNA が含まれている。本来、CC のプラスミド DNA のみで構成された DNA 試料を使用して実験を行うことが理想的であるが、DNA 抽出の際にある一定数の DNA には鎖切断が生じる。そこで、理想的条件として CC100%をトランスフェクションした場合の EGFP 発現細胞数を算出した。硬 X 線照射 DNA のアガロースゲル電気泳動実験の結果から、Control の DNA 試料には、CC が 0.986、OC が 0.015 の割合で含まれていた。Control 試料における EGFP 発現細胞数のうち  $0.015 \times N_{Control}$  個の細胞が OC のプラスミド DNA 由来で EGFP 発現していると仮定すると、理想的な実験条件として CC (100%) DNA を細胞に導入した場合の EGFP 発現細胞数  $N_{CC100\%}$  を式 (2-4) で算出した。この  $N_{CC100\%}$  をすべての時間で算出することで、理想的実験条件として CC (100%) DNA をトランスフェクションした場合の EGFP 発現細胞数の値とした。

$$CC_{100\%} = \frac{N_{Control} - (N_{OC} \times 0.015)}{0.986} \dots (2-4)$$

次に、 $N_{OC(t)}$  について議論した。本研究ではニッキング酵素として Nb.BsmI を使用し、結果より Nb.BsmI 処理した OC のプラスミド DNA のトランスフェクション効率は 48 時間時点においてコントロールに対して 88.2%だった。Nb.BsmI の認識配列はプラスミド DNA の EGFP 遺伝子部位の下流の異なる鎖上に 2 か所存在しており、ニック間

は約 100 bp 離れている。これを補正するために SSB の数に比例して EGFP 発現が減少すると仮定する。そのため 48 時間において SSB が 1 か所導入された場合のトランスフェクション効率を A とすると、SSB が 2 か所導入されたプラスミド DNA のトランスフェクション効率  $A' = (A)^2$  となり、 $A^2 = 0.882$  である。プラスミド DNA に導入された SSB の数 1~10 によってトランスフェクション効率が減少すると仮定すると、前述で求めた各吸収線量における SSB 生成頻度の確率と、CC100%の時の EGFP 発現細胞数により、以下の式 (2-5) から、ある培養時間において SSB 数が k 個導入された Open Circular form のトランスフェクション効率に依存した EGFP 発現細胞数を求める。

$$N_{OC(k)} = P(k) \times N_{CC100\%} \times B^k \dots (2-5)$$

$P(k)$  = プラスミド DNA に k 個の SSB が導入される確率 (SSB の生成数の確率)

$N_{OC(k)}$  = k 個の SSB が導入された時の培養時間 t における OC の EGFP 発現細胞数

$B = k$  個の SSB が導入された時の OC のトランスフェクション効率

この計算を SSB 数 1~10 の全ての場合、各吸収線量に対して、すべての培養時間での計算を行った。式 (2-5) で算出した SSB 数 1~10 の全ての場合での SSB が導入された Open Circular form の吸収線量におけるトランスフェクション効率に依存した EGFP 発現細胞数を足し合わせることで、OC の予測値  $N_{OC}$  を式 (2-6) より求めた。

$$N_{OC} = \int_{10}^0 N_{OC(k)} \dots (2-6)$$

最後に  $N_{L(t)}$  について議論する。酵素処理プラスミド DNA のトランスフェクションの結果より、HindIII 処理した Linear のプラスミド DNA のトランスフェクション効率はコントロールの 15.9% だった。しかし、“モデル DSB”の結果より Linear のプラスミド DNA のトランスフェクションの効率は DSB の導入位置により異なり、EGFP 遺伝子と DSB の距離が遠いほど EGFP 発現細胞数が増加し、結果的にトランスフェクション効率が高くな

る可能性が示唆された。そのため、予測値に使用する  $N_{L(t)}$  の値として HindIII 処理したプラスミド DNA のトランスフェクションの結果を使用すると予測値を過小評価してしまう可能性がある。そこで、4731 bp もの塩基対で構成される pEGFP-C1 プラスミド DNA 上に DSB が導入される確率がすべて等しく生じると仮定し、予測値算出に使用する理想実験条件の  $N_{L(t)}$  の値に条件ごとの係数 A を付けることで補正することにした。条件として以下の 4 つを使用した。

- ① HindIII 及び NheI の結果 (図 4.3 (a)) より、EGFP 遺伝子との塩基対距離が前後 100bp 以下の場合 (516bp~616bp+1329bp~1429bp)/4731bp=4.23%、トランスフェクション効率は HindIII 処理の結果を使用するため、係数は 1 とする。
- ② StuI の結果 (図 4.3 (b)) より、EGFP 遺伝子との塩基対距離が前後 1k bp 以上離れている場合 (2329bp~4347bp)/4731bp=42.65%、トランスフェクション効率は HindIII 処理の結果の約 2 倍程度を示すため、係数を 2 とする。
- ③ EGFP 遺伝子上に DSB が生じた場合、HindIII や NheI の結果よりもトランスフェクション効率は小さくなると考えられるため (616bp~1329bp=15.07%) 係数を 0 とする。
- ④ EGFP 遺伝子との塩基対距離が前後 100bp 以上であり、1000bp 未満である (①~③以外) 38.05%は実験的にはトランスフェクション効率の増加を調べていない。予測値を過大評価しないために係数を 1 とする。

以上の条件から、期待値としての係数 A を以下の式 (2-7) で求めた。

$$\text{係数}A = (1 \times 0.0423) + (2 \times 0.4265) + (0 \times 0.1507) + (1 \times 0.3805) = 1.276 \quad (2-7)$$

また各コンフォメーションをトランスフェクションした場合の t 時間後の一視野あたりの EGFP 発現細胞数を  $N_{CC100\% (t)}$ 、 $N_{OC^+ (t)}$ 、 $N_{L (t)}$ 、とする。EGFP 発現細胞数は導入し

たプラスミド DNA の量に比例すると仮定しているので、ある吸収線量の放射線を照射したときのコンフォメーション割合の場合での一視野あたりの EGFP 発現細胞数  $N$  は式 (2-8) で求めることが出来る。

$$N = \alpha \cdot N_{CC(100\%)} + \beta \cdot N_{OC} + A \cdot \gamma \cdot N_L \cdot \dots \quad (2-8)$$

一視野あたりの EGFP 発現細胞数の予測値  $N$  を各照射 DNA 試料と培養時間のすべてについて計算した。予測値  $N$  と実測値を各吸収線量で比較した (図 4.8)。



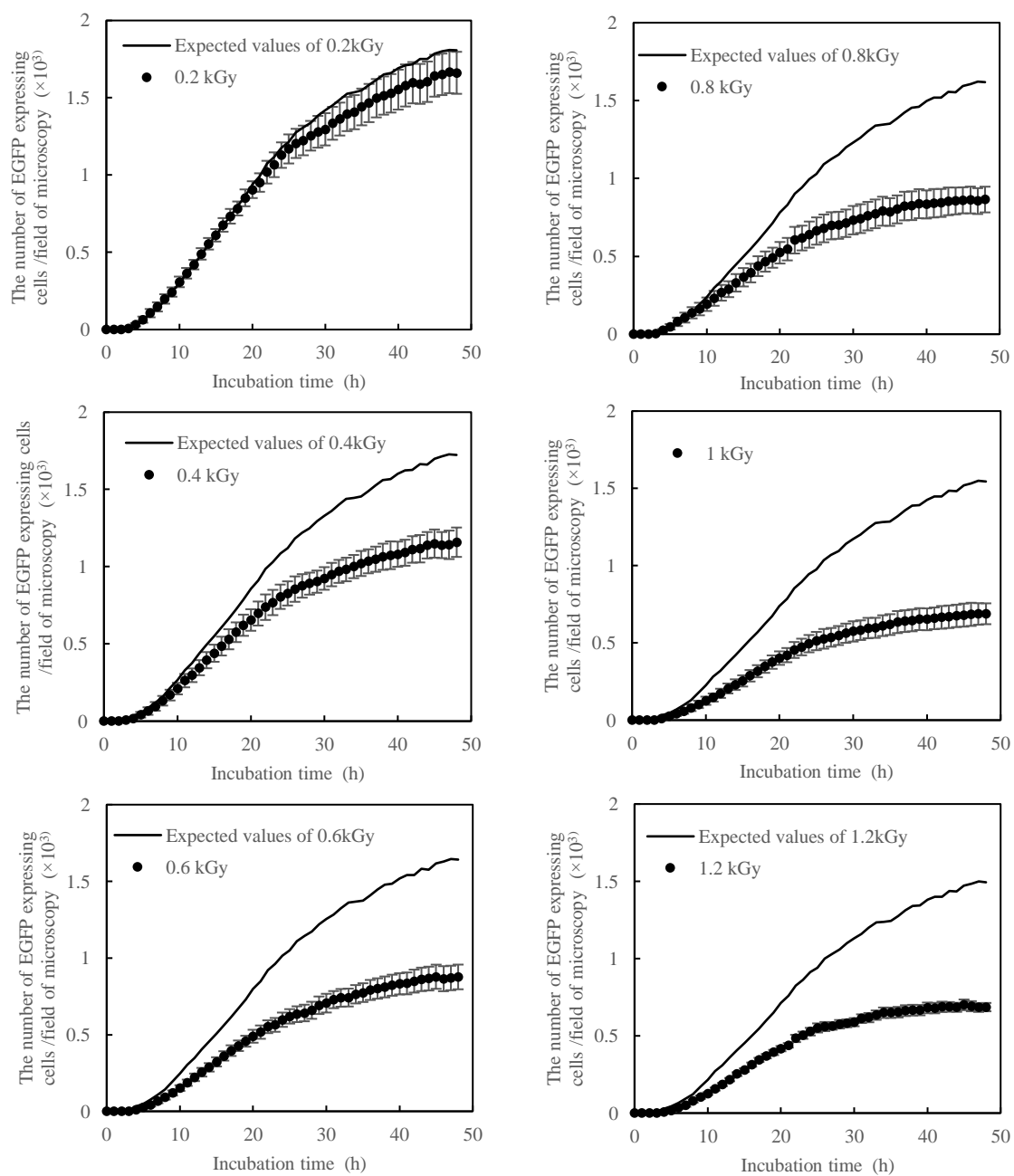


図 4.8 各吸収線量における SSB 生成頻度

各放射線量での SSB のポアソン分布を仮定して計算した、pEGFP-C1 プラスミド分子あたりの SSB 数の分布を示す。

## 2.4 考察

第二章では制限酵素を用いて DNA 鎖切断を人為的に導入し、これに対するトランスフェクションの効率を検討し、さらに Linear の DNA に着目し“モデル DSB”を用いた DSB サイト依存性を調べた。

はじめに、不完全な酵素処理による切れ残りのプラスミド DNA を検討するために、酵素処理したプラスミド DNA とさらにアガロースゲル電気泳動で Linear DNA のみを抽出したプラスミド DNA のトランスフェクション効率を比較した。その結果、酵素処理の際に生じる切れ残りプラスミド DNA の影響は非常に小さく、考慮する必要はないと結論付けた。さらに、プラスミド EGFP 遺伝子の細胞内ゲノム導入率を検討した結果、Closed Circular の DNA では約 2%程度、Linear の DNA ではわずかに EGFP 遺伝子のゲノム導入が示唆された。トランスフェクションによる EGFP の発現は一過性のものであり、細胞分裂を経ることでプラスミド DNA が細胞外へ放出もしくは完全に消化されることで EGFP の蛍光は観察されなくなる。7 日間培養後に EGFP を発現している細胞の多くは独立して存在していたことから、EGFP 発現細胞の細胞分裂自体が停止していると考えられる。一方で、「EGFP クローニング細胞集団」として計数した隣り合う複数の細胞で EGFP を発現する細胞集団（本研究では、8 個以上の EGFP 発現細胞群）は、細胞分裂が行われた後も EGFP を発現していることから、トランスフェクション後に組換え等によってプラスミド DNA の EGFP 遺伝子を細胞内ゲノムに組み込んだ細胞が分裂したものであると考えられる。本研究では、細胞内ゲノム導入率は非常に小さく、後述する予測値算出の際に考慮しなかったが、細胞内ゲノムへの遺伝子導入が細胞応答のどのような経路で生じるのか、酵素処理による DNA 鎖切断ではなく放射線による DNA 損傷に相関するのか等、新たな研究分野として発展が期待される。

次に、酵素処理により鎖切断を人為的に導入し、プラスミド DNA のコンフォメーションに依存したトランスフェクション効率及び、モデル DSB を用いてプラスミド DNA の切

断部位によってトランスフェクションの効率が変化するかを調査した。制限酵素により切断した 2 本鎖 DNA の末端が一本鎖の突出末端になるスティッキーエンド酵素である HindIII や NheI、平滑末端となる blunt エンド酵素のうち Aor51HI や SmaI はすべて同程度のトランスフェクション効率を示した。このことから、切断端の構造はトランスフェクション効率にほとんど寄与しないことが示された。また、EGFP 遺伝子と 1000bp 以上離れた所に制限酵素の認識配列を持つ StuI 試料では、EGFP 遺伝子の近傍に認識配列を持つ他の酵素よりも約 2 倍高いトランスフェクション効率を示した。この原因として、EGFP 遺伝子の位置が Linear DNA の末端から離れ中心に位置していたため、細胞内で完全に消化されにくかったためだと推測される。さらに、非常に興味深い結果として NheI と Aor51HI の制限酵素はプラスミド DNA の EGFP 遺伝子とプロモーター遺伝子の間を切断しているにもかかわらず、そのトランスフェクション効率は他の酵素処理 DNA と有意な差が見られなかった。Linear DNA が細胞内の DNA 修復酵素などの作用を受け、環状もしくは数珠状に修復された後、遺伝子発現している可能性が示唆された。これまで、細胞内に取り込まれた Linear DNA がどのような経緯を経て遺伝子発現をするのか未解明な部分が多かった。リポソームと直鎖状 DNA の複合体は細胞内に取り込まれにくく、取り込まれたとしても消化作用を受けることで遺伝子発現の効率は非常に小さいと考えられてきた。新たな仮説として、細胞内へ導入された Linear DNA は核膜内に取り込まれるイベントが起こるまでは構造的に不安定な末端から消化作用を受けるが、完全に消化される前に核膜内に輸送され、遺伝子領域が無事に残った場合、直鎖状から環状への再結合の有無にかかわらず、遺伝子発現される可能性が示唆された。本研究の結果により、Linear DNA であっても遺伝子領域が残されている場合比較的容易に遺伝子発現する可能性が示された。

これら新たに得られた知見を基盤に、酵素処理結果から得られた EGFP 発現細胞数から硬 X 線照射したプラスミド DNA をトランスフェクションした EGFP 発現細胞数の

「予測値」を算出した。実測値と予測値を比較すると 0.2 kGy においては大きな差異はなかった。吸収線量 0.2 kGy は  $1/e$  線量より小さい値であることから、プラスミド DNA への SSB 導入確率は平均 1 回未満である。このことから吸収線量 0.2 kGy では修復困難な DNA 損傷は誘発されず、プラスミド DNA 内に誘発された損傷は比較的容易に修復されたため、予測値との間に大きな差異が見られなかったと考えられる。一方、0.4 kGy 以上の吸収線量を与えた場合では実測値よりも「予測値」の方が有意に小さくなった。さらに両者の差は吸収線量に 0.6kGy までは依存して大きくなっていったが、0.8 kGy以上の吸収線量においては予測値と実測値の間の差は大きく開いているものの変化が見られなかった。予測値と実測値の間の差は制限酵素やニックング酵素処理によって導入される鎖切断とは異なる放射線照射に特有の損傷機構が照射プラスミド DNA 上に生成し、EGFP の発現阻害を引き起こしていると考えられる。

本研究で使用したニックング酵素は相補鎖に 2 つ目の認識配列を持っていたため予測値の算出において、実験によって得られた OC の EGFP 発現細胞数を SSB が 2 つ導入された場合の値として計算したが、実際に SSB が 1 つの場合と 2 つの場合では単純にトランスフェクション効率を二乗させた値になるとは限らない。今後は、現在使用している 2 つの認識配列を持つニックング酵素 Nb.Bsm I の他に、相補鎖を含めても認識配列を 1 つのみ有するニックング酵素や 3 つ以上もつニックング酵素を使用して、SSB 数に依存したトランスフェクション効率をそれぞれ実験によって算出し、これらの値に基づいた予測値を導出していく必要がある。

以上のことから本研究では、酵素処理したプラスミド DNA の EGFP 発現効率から「予測値」を算出し、放射線による難修復性の DNA 損傷の程度を評価することを可能にした。その際に、Linear のプラスミド DNA のトランスフェクション効率に DSB サイト依存性が存在しているという新たな知見が得られた。

研究をさらに発展させるうえで、クラスター損傷を構成する SSB や塩基損傷 AP サイトの修復や除去に関わる酵素がプラスミド DNA の放射線損傷に関してどのような働きを持つのかを観察していくことが非常に重要になる。塩基除去修復に関わる酵素をノックダウンした細胞に放射線照射プラスミド DNA を導入し修復効率を計測することで、放射線によって誘発されるクラスター損傷に対する損傷塩基特異的な修復を行う塩基除去修復の寄与を観察することが可能となる。例えば8-オキシグアニンを主な基質とする OGG1 やチミングリコールなどを主な基質とする NTH1 などの損傷塩基特異的グリコシラーゼをノックダウンした細胞において EGFP の修復効率の計測を行うことで、プラスミド DNA に誘発させたクラスター損傷を含む放射線損傷に対する塩基除去修復の寄与を観察することが可能となると考えられる。

## 結論

本研究は、放射線の線質及び照射時の水分子環境の違いが、生じた DNA 損傷の修復の難易性にどのような違いを与えるかを明らかにすることを目的とした。本研究の特徴は、EGFP プラスミド DNA を *in vitro* で放射線照射し非照射の細胞に導入するところにある。これにより細胞の核、細胞質をそこに存在する小器官、細胞膜とその上の膜タンパク質や細胞骨格の全てを完全な形で維持したまま、照射されたプラスミド DNA にコードされている EGFP 発現の経時変化をライブセル観察することが可能となる。得られた結果は、従来の予想を実験的に実証したと同時に、いくつかの点で従来の定説とは異なる事実も明らかにした。本研究を通じ得られた新しい知見は、放射線による DNA 損傷のメカニズムと損傷修復に対するより深い理解を可能にすると考ええる。

第一章は、照射により生じた一本鎖切断 (SSB) の量を基準とし、異なる水分子環境あるいは異なる線質による効果の違いを、平均1個の SSB 量が与えられた時の EGFP 発現細胞数として評価した。それぞれの条件で平均1個の SSB を与える線量は大きく異なるが、その線量の違いによらず生じた損傷に対する細胞の修復の難易度に関して本研究により得られた知見は、以下のとおりである。第一に、異なる水分子環境での硬 X 線照射では、線量あたりの鎖切断損傷数は水溶液試料が最も多く、従来より指摘されているように OH ラジカル等の水の分解生成物の効果が支配的である一方、これらの鎖切断は速やかに修復され、バルク水のない乾燥薄膜における二次電子による直接効果の方がより難修復性であることが初めて実証された。また水和条件下では、二次電子と OH ラジカル等が複合的に難修復性の損傷生成に寄与すると結論付けられた。第二に、実験室線源からの X 線、及びシンクロトロン放射施設で得られるリン K 殻励起エネルギー近傍の単色軟 X 線は、異なる光子エネルギー、エネルギー付与分布を持つが、ほぼ同じ DNA 修復効率を与えた。入射 X 線のエネル

ギーが異なっても、トラックエンドにおける二次電子のエネルギー分布はほぼ同じであるために、これらの二次電子による直接効果が DNA 修復難易性を決定したと結論付けられる。一方で高 LET のイオン線照射により、X 線の場合よりも EGFP 発現効率が低下した。ネオン (Ne) 線より LET の高い炭素 (C) 線照射では、その傾向が顕著に現れ、難修復性の DNA 損傷が LET に依存して誘発されていることが示唆された。高 LET 放射線により誘発した非二本鎖切断型 DNA 損傷 (クラスター損傷) が低 LET 放射線の場合と比べて難修復性であることを実験的に実証したのは、本研究が初めてである。また、この結果は長年未解明だった、高 LET 放射線が複雑な DNA 損傷を誘発させるために修復酵素の機能を阻害する可能性を裏付ける革新的な結果である。

第二章は、制限酵素を用いて SSB 及び DSB を人為的に導入し、DNA 鎖切断に対する EGFP 修復効率への影響を検討した。特に DNA 損傷の中でも重篤な損傷である DSB に着目して、複数の認識部位の異なる制限酵素を用いて EGFP 遺伝子に対する鎖切断部位の異なる DNA を“モデル DSB”として修復難易度を調べた。以上の研究結果を、第一章と比較することで得られた知見は以下のとおりである。モデル DSB の遺伝子発現効率は損傷位置と EGFP 遺伝子の距離が遠いほど高く、修復の過程もしくは細胞内の消化作用等により DNA 末端が削られることで修復阻害を受けていると考えられる。さらに、放射線照射プラスミド DNA の形態構成比率から EGFP 発現細胞数の効率について理論的予測値を算出したところ、実測値として得られた放射線照射 EGFP プラスミドに対する修復効率の方が酵素処理プラスミドのそれよりも圧倒的に低くなった。電離放射線を DNA に照射することで生じる鎖切断には酵素処理では生じない放射線特有の損傷が同時に生じており、そのため難修復性であることが結論付けられた。さらに興味深い知見として、DNA 遺伝子とその発現を司るプロモーターの間を切断した場合も遺伝子配列の下流近傍を切断したものと同程度の遺伝子発現が見られた。細胞内部の修復酵素による複雑な DNA 修復経路、あるいは逆にこれ

を使わないような原始的な修復応答による修復が行われた可能性が示唆された。

本研究で開発した EGFP プラスミドを利用する新たな手法を用いた結果から、電離放射線による DNA 損傷の難修復特性は、DNA のリン K 殻の光電効果あるいは OH ラジカルに加え二次電子の影響より増加するが、それ以上に放射線の LET の高さに強く依存することが示唆された。



## 参考文献

### 第一章「様々な放射線照射により誘発された DNA 損傷と遺伝子発現への影響」

- [1] 菱田豊彦. 放射線生物学 放射線と人間とのかかわりあい, 丸善プラネット株式会社 1998.
- [2] von Sonntag C. Chapter 6 DNA model systems: the base moiety, *The chemical basis of radiation biology*. Taylor & Francis, Germany, pp 117. 1987.
- [3] Shikazono N, Noguchi M, Fujii K, Urushibara A, Yokoya A. The yield processing, and biological consequences of clustered DNA damage induced by ionizing radiation. *J. Radiat. Res.* **50**, 27–36. 2009.
- [4] von Sonntag C. Chapter 12 DNA and double stranded oligonucleotides, *Free-radical-induced DNA damage and its repair*. Springer, Germany, pp359–360. 2005.
- [5] Shiina T, Watanabe R, Shiraishi I, Suzuki M, Sugaya Y, Fujii K, Yokoya A. Induction of DNA damage, including abasic sites, in plasmid DNA by carbon ion and X-ray irradiation. *Radiat. Environ. Biophys.* **52**, 99–112. 2013.
- [6] Goodhead DT. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations—clustered damage in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* **65**, 7–17. 1994.
- [7] Ward JF. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells : identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **35**, 95–125. 1988.
- [8] Shikazono N, Noguchi M, Fujii K, Urushibara A, Yokoya A. The yield, processing, and biological consequences of clustered DNA damage induced by ionizing radiation. *J. Radiat. Res.* **50**, 27–36. 2009.
- [9] Suzuki K, Ojima M, Kodama S, Watanabe M. Radiation-induced DNA damage and delayed induced genomic instability. *Oncogene* **22**, 6988–6993. 2003.
- [10] Nikjoo H, O'Neill P, Wilson WE, Goodhead DT. Computational approach for determining the spectrum of DNA damage induced by ionizing radiation. *Radiat. Res.* **156**, 577–583. 2001.
- [11] Nikjoo H, Bolton CE, Watanabe R, Terrissol M, O'Neill P, Goodhead DT. Modelling of DNA damage induced by energetic electrons (100 eV to 100 keV) . *Radiat. Prot. Dosim.* **99**, 77–80. 2002.
- [12] Watanabe R, Rahmanian S, Nikjoo H. Spectrum of radiation-induced clustered non-DSB damage – a Monte Carlo track structure modeling and calculations. *Radiat. Res.* **183**, 525–540. 2015.
- [13] Prise KM. A study of endonuclease III-sensitive sites in irradiated DNA: detection of alpha-particle-induced oxidative damage. *Carcinogenesis* **20**, 905–909. 1999.

- [14] Sutherland BM, Bennett PV, Sidorkina O, Laval J. Clustered damages and total lesions induced in DNA by ionizing radiation: oxidized bases and strand breaks. *Biochemistry* **39**, 8026–8031. 2000.
- [15] Sutherland BM, Bennett PV, Sidorkina O, Laval J. Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 103–108. 2000.
- [16] Milligan JR, Aguilera JA, Ward JF. Redox equilibrium between guanyl radicals and thiocyanate influences base damage yields in gamma irradiated plasmid DNA. Estimation of the reduction potential of guanyl radicals in plasmid DNA in aqueous solution at physiological ionic strength. *Int. J. Radiat. Biol.* **77**, 1195–1205. 2001.
- [17] Yokoya A, Cunniffe SM, O'Neill P. Effect of hydration on the induction of strand breaks and base lesions in plasmid DNA films by gamma-radiation. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 8859–8866. 2002.
- [18] Gulston M, Fulford J, Jenner T, de Lara C, O'Neill P. Clustered DNA damage induced by gamma radiation in human fibroblasts (HF19), hamster (V79-4) cells and plasmid DNA is revealed as Fpg and Nth sensitive sites. *Nucleic Acids Res.* **30**, 3464–3472. 2002.
- [19] David-Cordonnier MH, Laval J, O'Neill P. Clustered DNA damage, influence on damage excision by XRS5 nuclear extracts and Escherichia coli Nth and Fpg proteins. *J. Biol. Chem.* **275**, 11865–11873. 2000.
- [20] David-Cordonnier MH, Laval J, O'Neill P. Recognition and kinetics for excision of a base lesion within clustered DNA damage by the escherichia coli proteins Fpg and Nth. *Biochemistry* **40**, 5738–5746. 2001.
- [21] David-Cordonnier MH, Boiteux S, O'Neill P. Excision of 8-oxoguanine within clustered damage by the yeast OGG1 protein. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1107–1113. 2001.
- [22] Shikazono N, Pearson C, O'Neill P, Thacker J. The roles of specific glycosylases in determining the mutagenic consequences of clustered DNA base damage. *Nucleic Acids Res.* **34**, 3722–3730. 2006.
- [23] Pearson CG, Shikazono N, Thacker J, O'Neill P. Enhanced mutagenic potential of 8-oxo-7,8-dihydroguanine when present within a clustered DNA damage site. *Nucleic Acids Res.* **32**, 263–270. 2004.
- [24] 鹿園直哉, 漆原あゆみ, 藤井健太郎, 横谷明德. クラスターDNA 損傷の生物効果. *放射線生物研究会* **41**, 409–423. 2006.
- [25] Yokoya A, Cunniffe SM, Stevens DL, O'Neill P. Effects of hydration on the induction of strand breaks, base lesions, and clustered damage in DNA films by alpha-radiation. *J. Phys. Chem. B* **107**, 832–837. 2003.

- [26] Yokoya A, Shikazono N, Fujii K, Noguchi M, Urushibara U. A novel technique using DNA denaturation to detect multiply induced single-strand breaks in a hydrated plasmid DNA molecule by X-ray and  $^4\text{He}^{2+}$  ion irradiation. *Radiat. Prot. Dosimetry* **143**, 219–225. 2011.
- [27] Becker D, Sevilla MD. The chemical consequences of radiation damage to DNA. *Adv. Radiat. Biol.* **17**, 121–180. 1993.
- [28] Vere TL, Becker D, Sevilla MD. Yields of OH in Gamma-irradiated DNA as a function of DNA hydration: hole transfer in competition with OH formation. *Radiat. Res.* **145**, 673–680. 1996.
- [29] Nakaue H, Obata Y, Kaminaga K, Akimitsu N, Yokoya A. Visualization of the DNA repair process in mammalian cells transfected with EGFP-expressing plasmid DNA after exposure to X-ray. *Radiat. Prot. Dosim.* **183**, 79–83. 2019.
- [30] Obata Y, Hirasaki K, Akimitsu N, Yokoya A. Expression of the X-ray irradiated EGFP-plasmid transfected into non-irradiated human cells. *Radiat. Res.* **196**, 261–271. 2021.
- [31] Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma, *J. Natl. Cancer Inst.* **51**, 1409–1416. 1973.
- [32] Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Peterson Jr WD, Brenz R, McGrath CM, Russo J, Pauley RJ, Jones RF, Brooks SC. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10, *Cancer Res.* **50**, 6075–6086. 1990.
- [33] Milligan JR, Arnold AD, Ward JF. The effect of superhelical density on the yield of single-strand breaks in gamma-irradiated plasmid DNA. *Radiat. Res.* **132**, 69–73. 1992.
- [34] Hieda K, Hirono T, Azami A, Suzuki M, Furusawa Y, Maezawa H, Usami N, Yokoya A, Kobayashi K. Single- and double-strand breaks in pBR322 plasmid DNA by monochromatic X-rays on and off the K-absorption peak of phosphorus. *Int. J. Radiat. Biol.* **70**, 437–445, 1996.
- [35] Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 7413–7417. 1987.
- [36] Akinc A, Thomas M, Klibanov AM, Langer R. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis, *J. Gene Med.* **7**, 657–663. 2005.
- [37] Raju U, Effect of bile acids and estradiol on thymidine incorporation into DNA in MCF-7 and MCF-10A breast cell lines, *Steroids.* **62**, 643–646. 1997.
- [38] Kang HC, Huh KM, Bae YH. Polymeric nucleic acid carriers: current issues and novel design approaches. *J Control Release* **164**, 256–264. 2012.
- [39] Baker PR, Wilton JC, Jones CE, Stenzel DJ, Watson N, Smith GJ. Bile acids influence the growth, oestrogen receptor and oestrogen-regulated proteins of MCF-7 human breast cancer cells. *Br. J. Cancer* **65**, 566–572. 1992.

- [40] O'Neill P, Fielden EM. Primary free radical processes in DNA. *Adv. Radiat. Biol.* **17**, 53–120. 1993.
- [41] Michel D. Chapter 7 Brownian motion, *Molecular biophysics*. Oxford Univ Press, England, pp 155–159. 1999.
- [42] 勝村康介, 工藤久明. 第 5 章 水と水溶液の放射線化学, *東京大学工学教程 原子力工学放射線化学*. 丸善出版株式会社, 東京, pp 59–61. 2020.
- [43] Roots R, Okada S. Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in X-ray-induced DNA strand breaks or killing of mammalian cells. *Radiat. Res.* **64**, 306–320. 1975.
- [44] Kai T, Yokoya A, Ukai M, Fujii K, Toigawa T, Watanabe R. A significant role of non-thermal equilibrated electrons in the formation of deleterious complex DNA damage. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 2838–2844. 2018.
- [45] Terato H, Ide H. Clustered DNA damage induced by heavy ion particles. *Biol. Sci. Space.* **18**, 206–215. 2004

## 第二章「細胞内における線状化 DNA の細胞内遺伝子発現の低減」

- [1] Takaoka A, Taniguchi T. Cytosolic DNA recognition for triggering innate immune responses. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 847–857. 2008
- [2] Yanai H. Regulation of the cytosolic DNA-sensing system in innate immunity: a current view. *Curr. Opin. Immunol.* **21**, 17–22. 2009.
- [3] Haraguchi T, Koujin T, Shindo T, Bilir S, Osakada H, Nishimura K, Hirano Y, Asakawa H, Mori C, Kobayashi S, Okada Y, Chikashige Y, Fukagawa T, Shibata S, Hiraoka Y. Transfected plasmid DNA is incorporated into the nucleus via nuclear envelope reformation at telophase. *Commun Biol.* **5**, 78. 2022.
- [4] Groll A Von, Levin Y, Barbosa MC, Ravazzolo AP. Linear DNA low efficiency transfection by liposome can be improved by the use of cationic lipid as charge neutralizer. *Biotechnol. Prog.* **22**, 1220–1224. 2006.
- [5] McLenachan S, Sarsero JP, Ioannou PA. Flow-cytometric analysis of mouse embryonic stem cell lipofection using small and large DNA constructs. *Genomics.* **89**, 708–720. 2007.
- [6] Lehner R, Wang X, Hunziker P. Plasmid linearization changes shape and efficiency of transfection complexes. *Eur. J. Nanomed.* **5**, 205–212. 2013.
- [7] Hanai R, Yazu M, Hieda K. On the experimental distinction between ssbs and dsbs in circular DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* **73**, 475–9. 1998

## 謝辞

始めに、本研究を行う機会を与えてくださりました茨城大学大学院理工学研究科の横谷明德教授に深く感謝申し上げます。横谷先生には本研究の遂行に必要な知識や研究者としての姿勢など多くのことをご指導いただきました。さらに、研究に関することだけでなく社会に出ていくための常識や、他大学や外部研究施設での活動など大変貴重な機会を与えてくださいましたこと、改めて心より感謝申し上げます。

東京大学アイソトープセンターの秋光信佳教授には、プラスミドを用いた実験に関する様々な技術的なアドバイスを頂きました。大変お忙しい中でプラスミド DNA のライゲーション実験に関する実験手法や操作を直接ご指導いただきました。量子科学技術研究開発機構、放射線医学総合研究所の鈴木雅雄博士には QST 病院重粒子線がん治療装置 (HIMAC) でのイオン線照射に関してご指導をいただきました。大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構の宇佐美德子博士にはフォトンファクトリー (PF) 軟 X 線照射に関してご指導をいただきました。

日本原子力研究開発機構での学位研究を行うにあたり、茨城大学理学部の立花章教授には研究についてのご指導だけでなく多くのご助言をいただきました。量子生命科学研究所構造生物学研究チームの玉田太郎博士、渡辺立子博士、電子物性生命科学チームの藤井健太郎博士、廣瀬エリさん、大内則幸博士、野口実穂博士は研究面でのご指導ご助言はもちろんのこと、日々の研究のサポートやアドバイスをいただきましたこと感謝申し上げます。

茨城大学院の西久保開さんには学部生の頃から実験を行う上での様々なご助言、ご指導をいただきました。また、後輩である木名瀬暁理さん、伊東祐真君は同じ実験系に携わっていて、実験のサポートをしてくださいました。今一度感謝申し上げます。同じく横谷研究室の斉藤智幸君、山野下佳輝君、小沼草太君、竹下敬祐君、松本萌さんとは昼休みをはじめとした多くの時間を共にすごしました。皆さんのおかげで毎日楽しい時間を過ごすことができました。この場を借りて感謝申し上げます。

最後に、両親をはじめ、量子科学技術研究開発機構、量子生命科学領域の事務の方々、多くの方のご指導、ご尽力のおかげで博士後期課程 3 年間の研究を行うことができました。感謝申し上げます。

令和 5 年 3 月