

プラズマ照射によって生じる DNA 鎖切断および塩基修飾と細胞応答 DNA strand breaks and base modification induced by cold atmospheric pressure plasma irradiation

豊橋技科大 ○栗田 弘史, 春田 夏輝, 瀬戸 貴仁, 高島 和則

Toyohashi Univ. of Tech. ○Hirofumi Kurita, Natsuki Haruta, Takahito Seto, Kazunori Takashima

E-mail: kurita@chem.tut.ac.jp

大気圧低温プラズマの生体への照射は、抗腫瘍効果や止血など臨床への応用が期待されていることから近年盛んに研究されている。しかし、その作用機序や安全性についてさらなる理解が求められている。プラズマ照射が細胞に誘発する酸化ストレスは、生体内で DNA 損傷を介して遺伝毒性やアポトーシスなど重要な現象を誘発する可能性が報告されている。このことから、我々はプラズマ照射に対する細胞応答の解明に向け、あらゆる細胞に存在する DNA への影響を基軸として研究を進めてきた。酸化ストレスによって生じる DNA 損傷は、鎖切断、塩基修飾、糖修飾に大別され、我々も含めた先行研究のほとんどが鎖切断の解析であり、その他の損傷に関する報告は鎖切断に比較すると極めて少ない。このことから、アポトーシス誘導に関与する重要な修飾塩基のひとつである 8-オキシグアニン (8-oxoG) に注目した。

プラズマ源としてヘリウムプラズマジェットを用い、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) への照射で OH ラジカルと $O_2^{\cdot -}$ が生成していることが電子スピン共鳴とスピントラップ剤 CYPMPO を用いて示され、過酸化水素、亜硝酸イオン、硝酸イオンの生成も化学プローブ法で確認された。また、ヒト肺がん由来培養細胞株である A549 細胞に RONS 反応性蛍光プローブを導入して PBS に懸濁した後、同じ条件でプラズマ照射して蛍光強度をフローサイトメーターを用いて測定したところ、プラズマ未照射の細胞群と比較して細胞内 RONS レベルの有意な上昇が認められた。さらに、プラズマ照射によるゲノム DNA 損傷を単細胞ゲル電気泳動 (コメットアッセイ) で解析した結果、プラズマを照射した細胞のゲノム DNA 上に 1 本鎖切断 (SSB) だけでなく 8-oxoG が生じていることが示唆され、しかも SSB が生じないようなプラズマ照射条件であっても 8-oxoG が生じうることも明らかになった。また、DNA 損傷が生じるプラズマ照射であれば細胞生存率に影響を及ぼすと考え、プラズマ照射後の細胞懸濁液を遠心して

PBS を除去した後、細胞培養液に再懸濁して 24 時間培養したところ、ゲノム DNA に鎖切断や塩基修飾が生じるプラズマ照射条件であっても 90% に近い細胞生存率を示した。

以上のことから、ゲノム安定性維持のために DNA 修復機構が機能していると考え、8-oxoG を認識・除去する修復酵素の up-regulation を測定した。本研究では、グアニンが 8-oxoG に置換された蛍光標識 DNA プローブを用い、8-oxoG 修復酵素とこのプローブが反応することによる蛍光増大を指標として修復酵素の up-regulation を測定した。プラズマ照射前の A549 細胞にこのプローブを人為的に導入し、プラズマ照射から 24 時間後の細胞の蛍光強度を測定した結果、プラズマ未照射の細胞群と比較して、プラズマ照射した細胞群では蛍光強度が有意に増大した。プラズマ照射によって 8-oxoG が細胞内に生成し、ゲノム安定性維持のために DNA 修復機構が機能していることが示唆された。

[1] H. Kurita, *et al.*, PLoS ONE. 2020; 15(5): e0232724

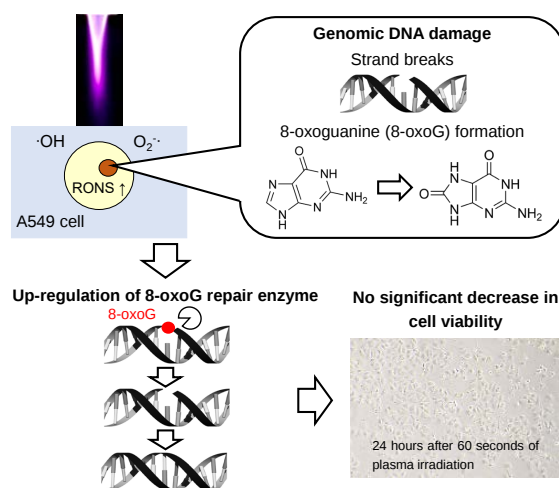


Fig. 1. Plasma irradiation that cannot result in a notable reduction in cell viability induced oxidative DNA damage. 8-oxoG formation was a more readily induced type of DNA damage than strand breaks. 8-oxoG repair enzymes were up-regulated after plasma irradiation.