

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26390096

研究課題名(和文) 大気圧低温プラズマによる細胞内DNA損傷の定量的解析による機構解明

研究課題名(英文) Analysis of DNA strand breaks induced by exposure to an atmospheric pressure plasma jet

研究代表者

栗田 弘史 (Kurita, Hirofumi)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70512177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、プラズマ医療における細胞応答の分子機構の解明に重要であるDNA損傷をターゲットにした。5'末端を蛍光物質で、3'末端を消光物質で修飾した、ステムループ構造をとりうるMolecular beacon (MB)を利用したDNA切断の迅速検出方法を考案した。プラズマジェットをMB溶液に照射し、照射後の溶液の蛍光強度を測定したところ、MBのステム部位が切断され、それまで近接していた蛍光物質と消光物質が分離し、蛍光増大が生じた。また人工細胞モデル(ベシクル)にMBを内封させてプラズマ照射しても蛍光増大を示したが、ベシクル崩壊は起きなかった。DNA切断因子の膜透過性が示された。

研究成果の概要(英文)：The use of a molecular beacon for rapid detection of DNA strand breaks induced by atmospheric pressure plasma jet (APPJ) irradiation was demonstrated. MBs are oligonucleotides that adopt a stem-and-loop structure and carry a 5'-fluorescent moiety and a 3'-nonfluorescent quenching moiety. Scission of the molecular beacon by APPJ irradiation leads to separation of the fluorophore-quencher pair, resulting in an increase in fluorescence that directly correlates with the DNA strand breaks. The results show that the increase in fluorescence intensity is proportional to the exposure time and the rate of fluorescence increase is proportional to the discharge power. In addition, This simple and rapid method allows the estimation of the extent of DNA stand breaks induced by exposure to a non-thermal plasma. In addition, it was shown that the plasma jet readily induced DNA-strand breaks in the cell model, surprisingly without any significant poration or rupture of the phospholipid membrane.

研究分野：プラズマエレクトロニクス

キーワード：プラズマ医療応用 大気圧低温プラズマ DNA損傷

1. 研究開始当初の背景

大気圧プラズマ照射の生体への作用メカニズムの理解のためには、生体分子・細胞・組織・個体の各階層に対してプラズマ照射が及ぼす影響の解析が重要である。研究代表者はこれまでに、生命に普遍的に存在する DNA 分子に着目して研究を進めてきた。細胞内の DNA が酸化ストレスなどによって損傷を受けると、糖修飾・鎖切断などを起こすことが知られている。DNA 鎖切断には一本鎖切断 (Single strand break: SSB) と二本鎖切断 (Double strand break: DSB) がある。SSB は DSB より高頻度で起こるが、正確に修復される。一方、DSB は SSB の場合よりも強い酸化ストレスなどを受けたときに生じる。DSB は生体内に複数の修復経路があるにも関わらず、修復に伴う遺伝情報の変化や修復不能を起こしやすく、突然変異や細胞死を起こしやすい。これらのことから、DNA 損傷は細胞の生死を分ける重大な現象である。

大気圧プラズマ照射による DNA 損傷の解析は 2008 年頃から報告されはじめ、そのほとんどがゲル電気泳動による解析結果であった。そこで研究代表者らは、ゲル電気泳動では解析困難な長鎖 DNA の鎖長を 1 分子レベルで計測して切断頻度を求める独自の方法論を確立した。しかし、上記の研究で対象としたのは水溶液中に懸濁した DNA の損傷であり、得られる情報が細胞内の DNA 損傷やそれを起因とする生命現象を反映しているかどうか不明であった。また、DNA 損傷を誘導する直接的な因子、すなわちプラズマ照射によって水溶液および細胞内に生成される化学種の同定・定量も必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、上記の未解決問題を解決すべく、人工細胞モデルのアイデアをプラズマ照射による DNA 損傷解析に取り込み、細胞内外の環境を単純化しつつ、従来の水溶液中 DNA の解析よりも生細胞に近づけて DNA 損傷を定量的に解析することにした。併せて生体応答に対する直接的な入力である水溶液中に生成される活性種の同定と定量を行い、構成的アプローチにより細胞内 DNA 損傷機構を考察する。これと従来の細胞応答解析を組み合わせることで DNA 損傷を起因とする生命現象の解明に寄与することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 大気圧プラズマジェット生成

本研究ではいくつかのプラズマ源を用いて実験を行ったが、本報告ではその一例として図 1 に示す大気圧プラズマジェット (APPJ) 発生装置を用いて行った結果についてまとめている。石英ガラス管 (外径 7.0 mm、内径 5.0 mm) の先端にアルミニウムテープを 2 箇所巻きつけ、上から高電圧電極、接地電極とし、電極間距離は 5 mm とした。二つの電極の周囲は絶縁油で満たした。大気圧下に

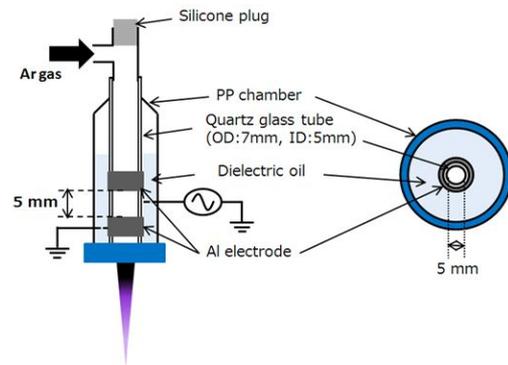


図 1 実験に使用したプラズマ源の一例

で高電圧を印加した場合、先端部分において高電圧電極と接地電極間で放電が発生する仕組みとなっている。電極周囲を絶縁油で満たすことで、ガラス管外壁で放電が発生しないようにした。本装置にアルゴンガスを流入させることにより装置先端から APPJ が放出される構造となっている。APPJ 発生装置へ高電圧を印加し、オシロスコープで測定しながら所定の電圧、周波数に調整した。キャリアガスにはアルゴンを用い、流量計にて流量を調整し、APPJ 発生装置へ供給した。照射距離はガラス管先端 (照射口) からサンプル液面までとした。

(2) プラズマジェット照射した溶液中の活性種計測

APPJ 照射により水溶液中に生成された RONS 測定には、電子スピン共鳴 (ESR) とスピントラッピング法を組み合わせる手法を用いた。スピントラップ剤として CYPMPPO を用いた。CYPMPPO は最終濃度が 10 mM となるように 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に溶解した。この 10 mM CYPMPPO 溶液 400 μ L を 24 穴プレートに入れ、サンプルが入ったウェルが APPJ 直下にくるようにプレートを設置した。

(3) Molecular beacon による DNA 切断の迅速計測

DNA 損傷は、5' 末端を蛍光物質で、3' 末端を消光物質で修飾した、ステムループ構造をとりうるオリゴヌクレオチド (Molecular beacon: MB) を利用した方法を新たに開発して評価した。酸化ストレスなどにより MB のステム部分が切断されると、それまで近接していた蛍光物質と消光物質が分離し、DNA 損傷を反映した蛍光増大が生じる (図 2)。40 塩基の MB は 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、95°C、3 分間加熱した後ゆっくりと室温まで下げてステムループ構造を形成させた。この溶液 400 μ L を 24 穴プレートに分注して大気圧低温アルゴンプラズマジェットを所定の印加電圧・照射時間で照射し、照射前後の溶液の蛍光強度を測定した。

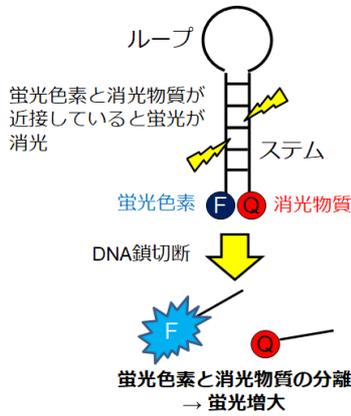


図2 Molecular beacon による DNA 切断の検出

4. 研究成果

(1) 溶液中活性種の計測

図1のAPPJ発生装置を用いた場合の典型的なESRスペクトルを図3に示す。観測されたESRスペクトルに示す印が $\cdot\text{OH}$ 、 ∇ 印が $\text{O}_2^{\cdot-}$ 由来で明確に区別できるスピニアダクトである。 ∇ 印のピークはSuperoxide dismutase (SOD)を添加することで消滅した。また、この時の溶液のpHは7付近であった。これらのスピニアダクトのシグナル強度とESRの内部標準であるマンガンマーカとの強度比を用いてシグナル強度の測定したところ、CYPMPO-OH、CYPMPO- $\text{O}_2^{\cdot-}$ スピニアダクトのESR相対シグナル強度は、照射時間依存的に増加した。本研究の実験条件では、照射距離40mm以上でプラズマが溶液に非接触となるため、この時にCYPMPO-OHスピニアダクトのESR相対シグナル強度が著しく低下した。また、照射距離30mm以上のとき $\text{O}_2^{\cdot-}$ の生成を確認したことから、照射距離が長くなると、プラズマと周辺空気との巻き込みが盛んになるため、空気中の酸素分子がAPPJと接触して $\text{O}_2^{\cdot-}$ の生成が促されたと考えられる。

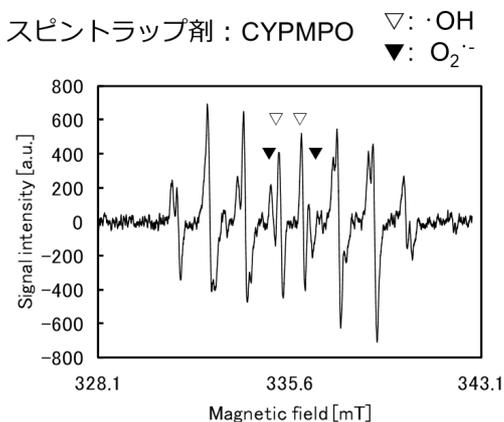


図3 電子スピン共鳴とスピントラップ剤による活性種の検出

(2) Molecular beacon による DNA 切断の迅速計測

プラズマジェットを所定の印加電圧・照射時間でDNA溶液に照射し、照射後の溶液の蛍光強度を測定したところ、蛍光強度は照射時間依存的に有意に増大し(図4)、その時間変化率は放電電力に比例した。また、照射距離依存性はOHラジカル生成特性とよく一致し、DNA切断の要因の一つがOHラジカルであることが考えられる。MBを用いた方法では、従来の電気泳動による方法と比較すると計測時間が圧倒的に短く、活性種反応性蛍光プローブと同じように扱うことが可能である。一方、生じたDNA切断がSSBかDSBかを区別することはできないが、電気泳動で観察されたDNA切断のほとんどがSSBであったことを考えると、ここで観察した蛍光増大はSSBによるものであると考えるのが妥当である。

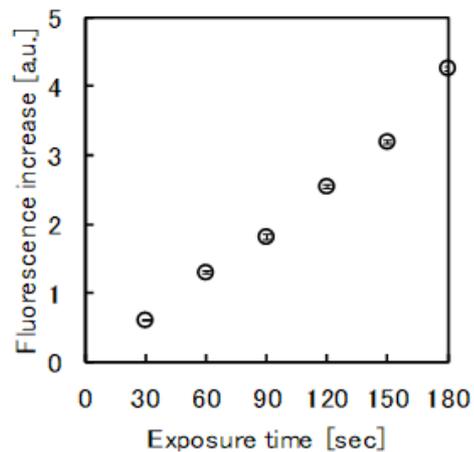


図4 照射時間とMB蛍光増大の関係

(3) 人工細胞モデル(ベシクル)に内封したDNAの切断

プラズマ照射によるDNA損傷機構の解明を目指して研究を進めてきたが、ここまではあくまでもDNA溶液への照射であり、細胞内に生じるDNA損傷とは大きな乖離がある。そこでリン脂質の分子集合体(ベシクル)を用いた人工細胞モデルに注目した。細胞膜は脂質やタンパク質などの生体分子から構成されるが、その基本構造はリン脂質からなる二分子膜である。リン脂質分子は水になじみやすい部分(親水性頭部基)と水とは混ざりにくい部分(疎水性尾部)の両方を持つ両親媒性分子である。合成リン脂質を用いると人工的に細胞膜モデルを構築することができ、本研究ではこのベシクルにMBを内封させてプラズマ照射した。その結果、MBをベシクルに内封させてもDNA溶液への照射と同様にDNA切断が生じたにも関わらず、ベシクルが崩壊していないことが明らかになった(図5)。これは人工細胞モデルを崩壊しないプラズマ照射でもその内部にDNA切断因子が侵入していることを意味する。プラズマ照

射による脂質の過酸化などによって細胞膜の流動性が変化したり、小孔が生じたりしていることが報告されているが、この場合のDNA切断因子の特定やその細胞膜透過機構の解明には至っていない。多種多様な分子で構成される実際の細胞では得ることが難しい知見が、単純な人工細胞モデルを用いるボトムアップアプローチで明らかになったと考えている。

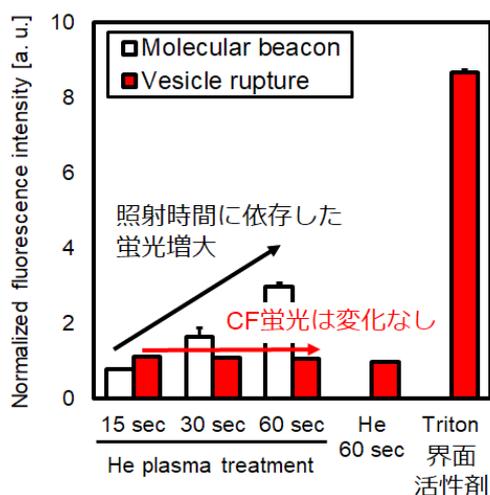


図5 人工細胞モデル(ベシクル)に内封したDNAの切断
ベシクル崩壊は、濃度消光するようにカルボキシルフルオレセイン(CF)を内封して蛍光増大を計測した。

その他、抗腫瘍効果において重要な役割を果たしていると考えられている、プラズマ照射後の細胞培養液中の過酸化水素・亜硝酸イオン・硝酸イオン濃度とプラズマ照射時のキャリアガス中の水分との関連を明らかにした。また、この細胞培養液に対するヒト由来培養細胞の細胞応答を計測し、細胞生存率やアポトーシス誘導を観察した。今後さらに研究を進めることで細胞内DNA切断に関連する細胞応答メカニズムが明らかになることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計12件)

1. E. Szili, N. Gaur, S.-H. Hong, H. Kurita, J.-S. Oh, M. Ito, A. Mizuno, A. Hatta, A. Cowin, D. Graves, and R. Short, "The assessment of cold atmospheric plasma treatment of DNA in synthetic models of tissue fluid, tissue and cells," *Journal of Physics D: Applied Physics*, Accepted on 25 May 2017. 査読有
DOI: 10.1088/1361-6463/aa7501
2. H. Kurita, J. Miyamoto, S. Miyachika, Y. Uchihashi, H. Yasuda, K. Takashima, and A.

Mizuno, "Production of reactive oxygen and nitrogen species in a cell culture medium exposed to an atmospheric pressure plasma jet," *MRS Advances*, vol. 2, pp. 987-993, 2017. 査読有

DOI: 10.1557/adv.2017.34

3. J.-S. Oh, E. J. Szili, N. Gaur, S.-H. Hong, H. Furuta, H. Kurita, A. Mizuno, A. Hatta, and R. D. Short, "How to assess the plasma delivery of RONS into tissue fluid and tissue," *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 49, 304005 (13 pp.), 2016. 査読有
DOI: 10.1088/0022-3727/49/30/304005
4. H. Kurita, S. Miyachika, H. Yasuda, K. Takashima, and A. Mizuno, "Use of molecular beacons for the rapid analysis of DNA damage induced by exposure to an atmospheric pressure plasma jet," *Applied Physics Letters*, vol. 107, 263702 (5 pp.), 2015. 査読有
DOI: 10.1063/1.4939044
5. H. Kurita, M. Shimizu, K. Sano, T. Nakajima, H. Yasuda, K. Takashima, and A. Mizuno, "Radical reaction in aqueous media injected by atmospheric pressure plasma jet and protective effect of antioxidant reagents evaluated by single-molecule DNA measurement," *Japanese Journal of Applied Physics*, vol. 53, 05FR01A (4 pp.), 2014. 査読有
DOI: 10.7567/JJAP.53.05FR01

[学会発表](計38件)

(招待講演)

1. Hirofumi Kurita, "Analysis of DNA damage induced by exposure to an atmospheric pressure plasma jet", Asian International Workshop on Plasma Science, 2016年2月13日, 名古屋大学(愛知県・名古屋市)
2. 栗田弘史, "大気圧プラズマ照射による生体分子損傷・細胞応答/静電界と油中液滴による遺伝子導入技術", 新学術領域研究「プラズマ医療科学の創成」+「統合的神経機能の制御を標的とした糖鎖の作動原理解明」合同公開シンポジウム「新学術の最前線～プラズマと生物と医療の協奏曲～」, 2015年8月6日, 名古屋大学(愛知県・名古屋市)
- (国際会議)
3. Hirofumi Kurita, Saki Miyachika, Junichiro Miyamoto, Hachiro Yasuda, Kazunori Takashima, and Akira Mizuno, "Production of reactive species and biomolecular damage induced by exposure to an atmospheric pressure plasma", International Conference on Plasma Medical Science Innovation (ICPMSI) 2017, 2017年2月27日, 名古屋大学(愛知県・名古屋市)
4. Hirofumi Kurita, Saki Miyachika, Hachiro

Yasuda, Kazunori Takashima, and Akira Mizuno, "Evaluation methods of DNA strand breaks induced by exposure to an atmospheric pressure plasma", The 6th International Conference on Plasma Medicine (ICPM-6), 2016年9月5日, Bratislava (Slovakia)

5. Hirofumi Kurita, Saki Miyachika, Hachiro Yasuda, Kazunori Takashima, and Akira Mizuno, "Analysis of DNA strand breaks induced by exposure to an atmospheric pressure plasma jet", 2016 IEEE International Conference on Plasma Science (ICOPS), 2016年6月22日, Banff (Canada)

その他、国際会議 14 件、国内学会 19 件

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ens.tut.ac.jp/electrostatics/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗田 弘史 (Hirofumi Kurita)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：70512177