

#### 【はじめに】

細胞における DNA 損傷は、内因性のメカニズム、外因性の要因、またはその両方の組み合わせによって引き起こされ、DNA 塩基の修飾、一本鎖切断、二本鎖切断などの多数の変化を引き起こすことが知られている。DNA の二本鎖切断によって、DNA 修復機構の活性化とヒストンタンパク質成分 H2AX のリン酸化によるリン酸化 H2AX ( $\gamma$ -H2AX) の形成を特徴とする DNA 損傷応答が引き起こされる<sup>1)</sup>。今回、当社が独自に開発したコーティング剤を塗布した 384 ウェルプレートを用いて、DNA 損傷を引き起こす Etoposide による  $\gamma$ H2AX 顆粒形成に関するアッセイを実施し、用量作用曲線の取得を試みた。

#### 【実験方法】

培地に懸濁した U-2 OS 細胞（ヒト骨肉腫由来）を 384 ウェルプレート（当社開発コーティング剤塗布及び滅菌済）へ 3,000 cells/ウェル播種し、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 環境のインキュベータ内で一晩培養した。

翌日、Etoposide を含む培地で置き換え（0.1  $\mu$ M ~ 100  $\mu$ M, N=7）、2 時間作用させた。各ウェルにおける DMSO 濃度は 1 % となるように調製し、Etoposide を加えないウェルには DMSO のみを添加した。

2 時間後、ウェル内の終濃度が 4% となるように 16%-パラホルムアルデヒド水溶液を加え、室温で 15 分間静置し細胞を固定化した。D-PBS (-) で 3 回洗浄した後、膜透過処理液を加え室温で 5 分間静置し、D-PBS (-) で 2 回洗浄した。次にブロッキング溶液を加え、室温で 1 時間静置後、D-PBS (-) で 2 回洗浄した。

希釈液で濃度調製した  $\gamma$ H2AX 抗体、 $\alpha$ -Tubulin 抗体を各ウェルに分注し、4°Cで一晩静置した。D-PBS (-) で 3 回洗浄後、2 次抗体及び核染色液を加え室温で 1 時間遮光静置した。D-PBS (-) で 3 回洗浄後、CQ1（40 倍対物レンズ、Range 25  $\mu$ m、Z スライス 10 枚）で  $\gamma$ H2AX（緑）、 $\alpha$ -Tubulin（赤）、細胞核（青）を撮影した。 $\gamma$ H2AX の撮影画像を画像解析ソフトにて解析し、蛍光強度を求め、Etoposide の濃度に対する  $\gamma$ H2AX の用量作用曲線を作成した（Table 1, Fig.1）。

Table 1. 細胞、試薬、撮影装置

細胞培養	プレート	当社開発コーティング剤を塗布した 384 ウェルプレート
	細胞	U-2 OS (#92022711, ECACC)
	培地	McCoy's 5A (#16600082, Thermo Fisher Scientific)+10%FBS (#172012-500mL, Thermo Fisher Scientific) + 1% Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (# 26253-84, Nacalai Tesque)
薬剤応答	薬剤	Etoposide (#E0675, TCI) : 10mM in DMSO stock solution を調製
染色	固定化試薬	16%-パラホルムアルデヒド水溶液 (#11850-14, Electron Microscopy Sciences)
	膜透過処理液	0.5% Triton X-100 (#35501-02, Nacalai Tesque) in D-PBS (-)
	ブロッキング溶液	ブロッキングワン histo (#06349-64, Nacalai Tesque)
	1 次抗体	<ul style="list-style-type: none"> <li>Anti-gamma H2A.X (phospho S139) (#ab11174, Abcam), 希釈倍率 1:1000</li> <li>Anti-alpha Tubulin antibody [DM1A] (#ab7291, Abcam), 希釈倍率 1:1000</li> </ul>
	2 次抗体	<ul style="list-style-type: none"> <li>Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ Plus 488 (#A32731, Invitrogen), 希釈倍率 1:250</li> <li>Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ Plus 594 (#A32742, Invitrogen), 希釈倍率 1:250</li> </ul>
	核染色液	<ul style="list-style-type: none"> <li>NucBlue™ Live ReadyProbes™ Reagent (Hoechst 33342) (#R37605, Thermo Fisher Scientific)</li> </ul>
	希釈液	ブロッキングワン histo を D-PBS (-) で 20 倍希釈した溶液
撮影及び解析	撮影装置	共焦点定量イメージサイトメーター CellVoyager CQ1 (Yokogawa Electric)
	画像解析ソフト	CellPathfinder (Yokogawa Electric)



Fig.1 Assay flow of forming  $\gamma$ H2AX with Etoposide within U-2 OS cells nuclei.

#### 【結果及び考察】

$\gamma$ H2AX (緑)、 $\alpha$ -Tubulin (赤)、細胞核 (青) を染色した U-2 OS 細胞を CQ1 で撮影したところ鮮明な撮影像が得られた。Etoposide 濃度に依存して細胞核内に  $\gamma$ H2AX の顆粒形成が見られ、顆粒の蛍光強度を画像解析することで用量作用曲線が得られた (Fig.2、Fig.3)。

#### Etoposide

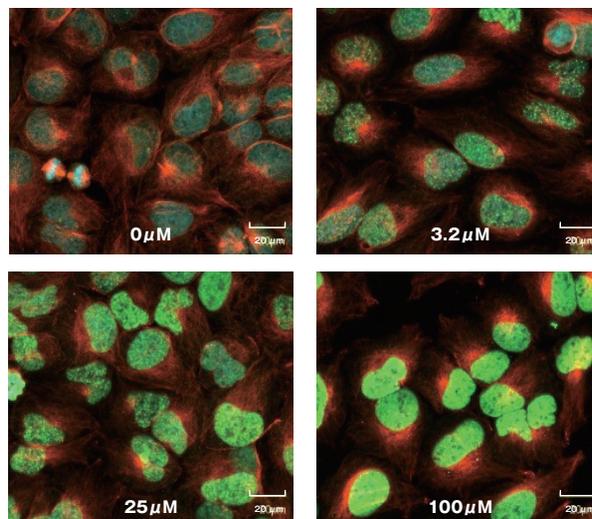


Fig.2 Imaging of forming  $\gamma$ H2AX with Etoposide within U-2 OS cells nuclei.

$\gamma$ H2AX (緑)、 $\alpha$ -Tubulin (赤)、細胞核 (青)、40倍対物レンズの撮影像を拡大、スケールバーは 20  $\mu$ m

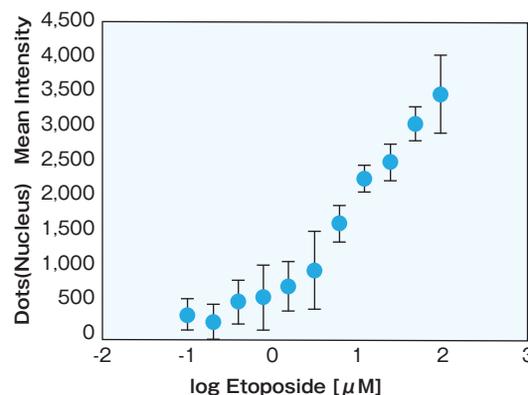


Fig.3 Dose response for forming  $\gamma$ H2AX with Etoposide within U-2 OS cells nuclei.

#### 【参考文献等】

- 1) Felicite K, Amber A, et al (2021) Detection and quantification of  $\gamma$ -H2AX using a dissociation enhanced lanthanide fluorescence immunoassay. Scientific Reports 11:8945

