



공학석사 학위논문

γ -H2AX foci 분석을 이용한 저선량 X선 피폭 시 과민감성 현상에 대한 연구

Study on the Low Dose HyperRadiosensitivity through γ-H2AX Foci Analysis

2022년 8월

서울대학교 대학원

에너지시스템공학부

김태규

γ -H2AX foci 분석을 이용한 저선량 X선 피폭 시 과민감성 현상에 대한 연구

지도 교수 김 은 희

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함 2022년 8월

> 서울대학교 대학원 에너지시스템공학부 김 태 규

김태규의 공학석사 학위논문을 인준함 2022년 8월

위 钅	원장	<u>심 형 진</u>	(인)
부위	원장	김 은 희	(인)
위	원	이 의 섭	(인)

초 록

저선량 방사선 피폭을 평가하는 것은 오랜 기간 동안 방사선 방호 및 치료 분야에서 중요한 과제이다. ICRP는 저선량 영향을 평가하는데 LNT(Linear Non-Threshold) 모델을 사용하도록 권고한다. 그러나 이에 반하는 저선량 방사선의 생물학적 특성들이 발견되어 여전히 저선량 방사선의 영향 특성에 대해 활발히 연구가 진행되고 있다. 그 중에서도 저선량 영역(<0.3Gy)에서 LNT 모델에 기반한 예측보다 낮은 세포 생존 확률을 보이는 HRS (Hyper Radio Sensitivity) 현상이 관찰되었다. HRS 현상의 메커니즘에 대해 많은 연구가 진행되었지만 DNA repair와 HRS 현상 간 해석에 대해 명확하게 논의되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 방사선 유도 DSB를 평가하기 위하여 γ-H2AX foci 분석을 진행하였고 이를 통하여 HRS 현상과 DSB의 발현 및 repair 사이의 관계를 확인하는 연구를 진행하였다.

0.125, 0.5, 1.5 Gy/min 선량률에서 암세포인 Rat gliosarcoma 세포에 대해 방사선 조사 후 1시간 경과 후 0.1 Gy 선량 피폭 시 선형관계 수치를 초과하는 foci 수를 기록하였다. 24시간 경과 후에는 0.2 Gy 선량 피폭 시 선형관계 수치를 초과하는 foci 수를 기록하였다. 이를 통해 저선량 구간에서 Foci의 발현 시점과 회복 시점에서 모두 HRS현상이 관측됨을 확인하였다. 또한 선량률이 클 때, 조사 후 1시간부터 24시간 경과에 따른 Foci 수 감소 정도가 커서 선량률이 높을 때 DSB 손상의 복구율이 큰 것을 확인하였다. 추가적으로 DSB의 손상 복구 효율을 계산하였다. 0.125 Gy/min 선량률로 0.2 Gy와 0.3 Gy 피폭의 경우 0.5 Gy/min 선량률로 0.2 Gy 피폭의 경우 유의미한 DSB의 회복이 진행되지 못하였고 반대로 1.5 Gy/min의 선량률로 피폭 시 전 선량 구간(0.1 ~ 0.5 Gy)에서 유의미한 회복이 확인되었다. 요약하면, 저선량 (< 0.5 Gy) 피폭 시 유의미한 정도의 DSB 손상 복구가 진행되지 않는 선량 구간이 존재하고 이 구간은 선량률이 증가함에 따라 축소됨을 확인하였다. 마지막으로 0.1 Gy의 피폭 시

i

유의미한 회복이 이루어진 이유에 대해 논의 하고자 Foci 크기 분포 분석을 진행하였다. 그 결과 방사선 조사 후 2시간 경과 후부터 complex DSB가 회복에 관계됨을 확인하고 complex DSB의 절대적인 수가 회복에 영향을 주고 있음으로 추정하였다.

본 연구에서는 앞서 HRS현상에 대해 저선량 영역에 방사선에 대해 과민하게 반응한다는 일반적으로 알려진 사실과는 달리 HRS 현상을 선량과 선량률이 특정 값 보다 작을 때, 유의미한 회복이 일어나지 못하여 많은 세포들이 사멸되다가 선량이 증가함에 따라 세포 회복 기작의 발현 정도가 증가하여 세포 사멸이 줄어드는 현상으로 설명하였다. 또한 DSB의 회복 기작의 발현 정도는 선량, 선량률, DSB의 복잡도에 의해 결정됨을 확인하였다.

이번 연구를 통해서 HRS 현상을 결정하는 요인으로 DSB의 복잡도를 언급함으로써 회복이 잘 진행되지 못하는 선량/선량률 조건에서 DSB의 복잡도를 고려한 위해성의 판단이 필요함을 제언하였다. 마지막으로 암 치료를 위한 방사선 치료 계획 시 HRS 현상을 고려할 필요가 있음을 제언하였다.

주요어 : 저선량 방사선, HRS 현상, DSB repair, γ-H2AX 분석, γ-H2AX 탈 인산화율, γ-H2AX foci 크기 분석, DSB 복잡도,

학 번:2020-26515

목	차
복	ネ

제 1 장 서 론 제 1 절 연구의 배경 제 2 절 연구의 내용	1
 제 2 장 배경 이론 제 1 절 저선량 방사선 과민감성 현상 제 2 절 DSB와 γ-H2AX 분석의 원리 제 3 절 γ-H2AX의 특징 제 4 절 γ-H2AX의 탈인산화 	3 5 9 10
 제 3 장 대상 및 방법. 제 1 절 세포 및 세포 배양 제 2 절 X선 조사. 제 3 절 γ-H2AX 분석 실험. 제 4 절 Foci 이미지 분석. 제 5 절 통계 분석. 	12 12 13 15 17 18
제 4 장 실험 결과 제 1 절 γ-H2AX Foci Formation of Gliosarcoma Cells 제 2 절 Fractional Repair Rate of Gliosarcoma cells	19 19 23
제 5 장 논 의. 제 1 절 HRS 현상과 DSB 회복 간의 관계 제 2 절 연구의 의문점 및 Foci 크기 분석 제 3 절 0.1 Gy 선량에서 DSB 회복율이 높은 원인 제 4 절 시간에 따른 HRS 피크 선량의 변화 제 5 절 Rat Diencephalon Cell 분석 제 6 절 방사선 방호에서 가지는 의의 제 7 절 방사선 치료에서 가지는 의의 제 8 절 연구의 정확성 및 추가 실험 논의	25 28 34 35 37 41 41 42
제 6 장 결 론	43
참고문헌	45
Abstract	49

표 목차

그림 목차

[Figure 2.1] HRS 현상을 나타내는 선량-생존율 그래프의 예시. 실선 은 IR 모델에 의한 fitting 결과를 점선은 LQ 모델에 의한 fitting 결과 [Figure 2.2] DNA 손상의 유형과 γ-H2AX을 포함한 회복 단백 질들의 발현 메커니즘......7 [Figure 2.3] 세포의 핵과 γ-H2AX foci 사진. 주황색 영역은 핵을 그리고 핵 안의 초록색 점은 γ-H2AX foci을 의미한다. 이 사진은 본 실험의 rat gliosarcoma cell, 1.5Gy/min, 0.5Gy, after 1h irradiation 조건에서의 사진이다......8 [Figure 2.4] 시간에 따른 손상된 DSB의 수리 후 남아있는 DSB 의 비율. 시간 반응 함수는 지수 감소 형태를 이루며 NHEJ repair 방법의 결함이 있는 경우 정상 세포에 비하여 회복율이 느 [Figure 2.5] 관전압 150kVp에서의 X선 에너지 스펙트럼.....14 [Figure 2.6] 본 실험에서 진행한 γ-H2AX 분석 실험의 단계 및 원리......16 [Figure 4.1] Excess numbers of y-H2AX foci recorded 1h post-irradiation in rat gliosarcoma at dose rates of (a) 0.125. (b) 0.5, (c) 1.5 Gy/min......20 [Figure 4.2] Excess numbers of γ -H2AX foci recorded 24h post-irradiation in rat gliosarcoma at dose rates of (a) 0.125, (b) 0.5, (c) 1.5 Gy/min......21

[Figure 4.3] DSB repair rates over time 1 to 24 h postirradiation in rat gliosarcoma cells exposed to 0.1 to 0.5 Gy at dose rates of (a) 0.125, (b) 0.5, and (c) 1.5 Gy/min......24 [Figure 5.1] Dose-response curves showing the numbers of normal cells with phosphorylated ATM after exposure to high-dose-rate(HDR: open symbols, 2 Gy/min) or lowdose-rate (LDR: closed symbols,0.3 mGy/min) radiation..26

[Figure 5.10] DSB repair rates over time 1 to 24 h postirradiation in rat diencephalon cells exposed to 0.1 to 0.5 Gy at dose rates of (a) 0.125, (b) 0.5, and (c) 1.5 Gy/min.....40

제1장서 론

제 1 절 연구의 배경

저선량 방사선 피폭을 평가하는 것은 오래 기간 동안 방사선 방호 및 치료 분야에서 중요한 과제이다. ICRP 35 (2005) 에서는 100mSv의 선량 영역에서부터 암 발생의 위험이 확인된다고 밝혔다. [1] 100mSv 이하의 선량에 대한 임상 데이터들은 불명확하고 불충분하여 저선량 방사선 영향 평가를 진행하기 어렵다. ICRP는 저선량 영향을 평가하는데 LNT(Linear Non-Threshold) 모델을 사용하도록 권고한다. [1] 그러나 이에 반하는 저선량 방사선의 생물학적 특성들이 발견되어 여전히 저선량 방사선의 영향 특성은 주요 연구 과제이다.

방사선에 대한 민감성을 평가하는 것을 목적으로 오랜 기간 동안 in vitro 실험인 세포 군집형성능 평가가 실시되었다. 기술 발전에 따라 저선량 방사선 조사에 대한 데이터의 정확도와 신뢰도를 확보할 수 있었고 저선량 영역(<0.3Gy)에서 LNT 모델에 기반한 예측보다 낮은 세포 생존 확률을 보이는 HRS (Hyper Radio Sensitivity) 현상이 관찰되었다. [2] 그러나 세포 군집형성능 평가를 통해서는 저선량 방사선 효과의 메커니즘을 밝히기 어려웠다.

HRS 현상의 메커니즘을 확인하기 3위하여 세포 주기 역학, DNA의 손상 및 수리 과정, 세포 사멸 메커니즘 등을 관찰점으로 하는 실험이 수행되고 있다. [3, 4] 초기의 연구에서는 HRS 현상의 메커니즘으로 0.3Gy 선량 미만의 방사선 피폭의 경우 세포 주기 조절 단백질 중 하나인 ATM (Ataxia Telangiectasia-Mutated)의 활성화가 이루어지지 못해 Early G2 phase arrest가 진행되지 않는 것을 관찰하였다. 이에 따라 세포는 손상된 DNA의 회복 메커니즘의 부재로 인하여 세포 자살(apoptosis)이 유도되고 생존율의 감소가 발생하게 된다. [5] 그러나 최근에는 DNA 손상의 repair 과정이 HRS 현상의 결정적인 요소로 논의되고 있다. [6] 실제로 인간 세포에서 세포 생존율 외 염색체 이상과 소핵 유도 등의 다양한 관찰점에서 HRS 현상이 관찰되었다. [7,8]

방사선 영향의 물리적 현상으로서 DNA 손상은 저선량 방사선의 인체 영향 효과를 평가하는 중요한 관찰점이 된다. DNA 이중나선손상 (double strand break or DSB)은 세포 사멸 및 유전적변이를 유발할 수 있는 주요 방사선 반응 요소이며 γ-H2AX foci 분석을 통해 관찰이 가능하다. γ-H2AX foci는 핵 내에서 개별 DSB 생성에 대응하여 형성되고, 따라서 γ-H2AX foci의 수는 생성되는 DSB의 양을 가늠하는 지표가 된다. [9].

γ-H2AX foci 분석의 또 다른 관찰점으로 foci 수의 감소율이 있다. DSB가 repair 될 때, γ-H2AX 단백질은 탈 인산화 되고 결과적으로 γ-H2AX foci의 수는 감소된다. [10] 따라서 탈 인산화의 특성을 통해서 DNA 수리 능력을 평가할 수 있고 이는 세포의 방사선 민감성과 음의 상관관계를 가진다. [11, 12]

γ-H2AX foci 분석을 통해 HRS현상의 메커니즘을 확인하는 데이터는 적거나 명확하지 않다. Wykes et al에 따르면 HRS 현상이 DNA damage 인식 실패에 기여한 것은 아니나 foci의 수의 차이는 없다고 했다. [13] 그러나 일부 연구에서는 γ-H2AX foci 와 HRS 현상의 연관성을 발견하였다. [14,15] 이와 같이 HRS 현상과 γ-H2AX foci 사이의 관계성이 확증되지 않았기 때문에 본 연구에서는 γ-H2AX foci의 발현과 탈 인산화 특성을 통해 HRS 현상과 DSB의 관계를 규명하고자 한다.

제 2 절 연구의 내용

본 연구에서는 정상 세포인 Rat Diencephalon Cell과 종양 세포인 Rat Gliosarcoma Cell을 사용하여 HRS 현상과 DSB의 발현 및 repair 사이의 관계를 확인하는 것을 목표로 한다. 방사선 유도 DSB를 평가하기 위하여 γ-H2AX foci 분석을 진행하였고 DSB의 repair를 확인하기 위해 조사 후 분석 시간까지의 차이를 두어 γ-H2AX foci를 측정하였다. 이후에는 선량률의 변화가 회복 속도와 HRS 현상에 어떤 영향을 끼치는지 분석하기 위하여 선량률을 변화시켜가며 실험을 수행하였다. 모든 방사선은 서울대학교 방사선 생명공학 연구실의 X선 발생기를 사용하여 조사하였다. 본 연구 결과를 통해 저선량 HRS 현상에 대한 DNA 회복 속도와의 연관성을 확인하였으며, 방사선 방호 및 치료 관점에서 HRS 현상에 대한 연구 방향을 제시하였다.

제 2 장 배경 이론

제 1절 저선량 방사선 과민감성 현상

저선량 과민감성 현상은 0.3 Gy 이하의 저선량 영역에서 LQ 모델에 반하여 더 낮은 생존율을 보이는 현상을 의미한다. (Fig 2.1) 선량에 대한 세포 생존율의 그래프는 0.3 Gy에서 감소하였다가 선량이 증가함에 따라 LQ 모델의 수준으로 생존율이 회복된다. 이렇게 세포 생존율이 회복되는 현상은 IRR이라고 한다. LQ 모델은 lea's target theory의 근거하여 chadwick과 leenhoust가 방사선에 대한 세포 생존율을 추정한 모델이다. [16] 해당 모델에서는 단위 선량 당 동일한 손상 확률(LNT)을 가정하여 세포 생존율을 계산한다.

HRS 현상은 인간을 포함한 포유류 세포에서 확인되었으며 X선, γ선 뿐만 아니라 다양한 입자의 방사선에서 나타나는 것으로 확인됐다. [17-20] 다만 그 강도는 세포, 방사선의 종류, 선량률에 따라 다르게 나타난다.

HRS 현상의 메커니즘으로, 0.3Gy 미만의 방사선의 경우 세포 주기 조절 단백질인 ATM (Ataxia Telangiectasia-Mutated)의 활성화가 이루어지지 못해 early G2 phase arrest가 진행되지 않는 것이 제시되기도 한다. 손상된 DNA의 회복 메커니즘의 부재로 인하여 세포 자살(apoptosis)이 유도되고 생존율의 감소가 발생한다고 설명한다. [5] 한편, HRS 현상에서 손상된 DNA의 수리에 관여하는 단백체의 역할에 대한 연구가 보고된 바가 있다. [6]

HRS 현상의 선량률 효과는 명확하지 않다. Marples et al.에서는 HRS 현상에 선량률의 효과는 없으며 같은 선량(0.2~0.3 Gy) 구간에서 HRS 현상이 일어났다고 주장했다. 그러나 Thomas et al.은 HRS 현상이 일어나는 선량 영역이 선량률에 따라 다르다고 주장했다. [2, 36] Rat Diencephalon Cell과 Rat Gliosarcoma Cell을 이용한 실험에서는 특정 선량률 이상에서는 HRS현상이 나타나지 않는다고 보고했다. [21]

З



Figure 2.1 HRS 현상을 나타내는 선량-생존율 그래프의 예시. 실선은 IR 모델에 의한 fitting 결과를 점선은 LQ 모델에 의한 fitting 결과를 나타낸다. [3]

제 2 절 DSB와 γ-H2AX 분석의 원리

DNA는 핵염기, 디옥시리보스, 인산기로 이루어진 중합체의 두 개의 긴 가닥이 서로 꼬여 있는 이중 나선 구조로 되어 있다. DNA는 유전 정보를 가지고 있으며 이로 인해 세포의 기능에서 매우 중요한 역할을 한다. 만약 DNA 결합의 손실 혹은 돌연변이가 발생하면 유전적 기능을 상실한다. 핵 염기는 4 종류의 사이토신, 구아닌, 아데닌, 티민으로 이루어져 있으며, 아데닌-티민, 사이토신- 구아닌의 상보 결합을 형성한다. 따라서 만약 DNA에 하나의 염기에 대해 손상이 일어난다면(single strand break, SSB) 유전 정보의 손실 없는 완전한 회복이 가능하다. 그러나 DNA에 양쪽 염기의 손상이 발생하면(double strand break, DSB) 완전한 회복이 어렵다. DNA DSB는 동일한 시간에 특정 지역에 많은 양의 에너지가 전달되거나 2개 이상의 근접한 SSB에 의해 형성될 수 있다.

DNA DSB의 repair는 NHEJ, HR, MMEJ의 방법에 따라 이루어진다. [22, 23] NHEJ, MMEJ는 구체적으로는 다르지만 DNA 2가닥의 끊어진 점을 연결하는 방식이다. 이러한 방법은 빠르게 DSB를 repair할 수 있으나 유전적 장애 및 돌연변이의 위험을 가지게 된다. 그럼에도 불구하고 발생할 수 있는 심각한 문제들을 막기 위해 이루어진다. HR 방식은 상동 염색체를 이용하여 손상 부위를 복제하는 방식이다. 비교적 느린 repair 방식이지만 유전적 장애 및 돌연변이의 위험이 없다.

이러한 복잡한 DSB repair의 과정 동안 γ-H2AX를 포함한 여러 종류의 repair 단백질들이 DSB의 위치에 발현된다. 그림(2.2)는 DNA의 손상 유형 및 repair 단백질들의 발현 메커니즘이다. [24]

H2AX는 손상된 DNA의 repair, 세포 분열 등의 반응과 관련이 있는 히스톤 단백질이다. DNA에 DSB가 형성되면 ATM 단백질은 H2AX를 빠르게 인산화시켜 DSB 근처에서 γ-H2AX를 발현시킨다. [25] 따라서 γ-H2AX에 반응하면서 관찰 가능한 항체를 이용한다면 DNA DSB의 발생을 분석할 수 있다.

γ-H2AX 발현을 분석하는 방법으로는 γ-H2AX와 결합하는
 형광성 항체, 즉 γ-H2AX foci의 수를 세는 방법 혹은 형광 신호의
 세기를 측정하는 방법이 있다. [9] Foci의 수를 세는 방법에서는 형광
 현미경이 사용된다. 형광 현미경을 통해서는 세포 핵 내의 형광 신호가

foci 형태로 관측된다. 저 LET 방사선에서는 대부분의 γ-H2AX foci는 DSB와 1대1으로 대응되기 때문에 foci를 관측하는 것으로 DSB을 정량화 할 수 있다. [26, 27] 또한 DSB 위치도 foci의 위치로부터 알 수 있다. (그림 2.3)는 γ-H2AX 초점과 핵의 이미지를 표현한 그림이다. 한편, 형광 신호의 세기는 유세포 분석기를 사용하여 측정한다. 유세포 분석은 액체 형태의 세포 샘플을 흘려보내면서 세포 내의 형광 신호를 읽어내는 방법이다. 유세포 분석 방법의 장점은 샘플을 만드는 과정이 단순하고 분석 결과가 안정적으로 나타난다는 점이다. 그러나 신호를 인식하기 위한 세포 당 발현되는 최소 형광량이 높아야 한다. 따라서 최소 0.5~1 Gy 이상의 고선량 피폭 세포에 대해서만 분석이 가능하다. [9] 따라서 본 연구에서는 사용하지 않았다. 일부 연구에서 γ-H2AX foci가 항상 DSB와 1대1 대응되지 않는다는 반박이 존재한다. [28, 29] 그러나 해당 현상들에 대해서는 명확히 밝혀지지 않았고 선량에 따른 DSB의 반응을 연구하는 데 문제가 없다. [30]



Nature Reviews | Cancer

Figure 2.2 DNA 손상의 유형과 γ-H2AX을 포함한 회복 단백질들의 발현 메커니즘 [24]



Figure 2.3 세포의 핵과 γ-H2AX foci 사진. 주황색 영역은 핵을 그리고 핵 안의 초록색 점은 γ-H2AX foci을 의미한다. 이 사진은 본 실험의 rat gliosarcoma cell, 1.5Gy/min, 0.5Gy, after 1h irradiation 조건에서의 사진이다.

제 3 절 γ-H2AX의 특징

γ-H2AX foci의 수는 생물학적 영향을 평가하는데 중요한 관측점이다. γ-H2AX foci의 수는 선량과 선형적인 반응 함수를 나타낸다. [27, 31] 함수의 선형성은 세포 종류와 방사선의 성질과 관련없이 나타난다. 그러나 해당 요소들은 선량에 따라 증가하는 foci의 양, 함수의 기울기를 결정한다.

γ-H2AX 실험은 DNA 손상에 의해 발현되는 단백질을 분석하는 방법이다. DNA는 작은 양의 에너지에 의해서도 손상될 수 있기 때문에 γ-H2AX 실험은 저선량 영역에서의 연구에서 폭 넓게 활용되고 있다. 다만 높은 선량 조건에 대해서는 γ-H2AX의 foci 겹쳐지는 현상에 의해 정확한 결과를 분석하기 어렵다. [9]

γ-H2AX foci는 오래 동안 유지되지 않고 몇 시간 혹은 며칠안에 사라진다. DNA 손상의 repair로 인하여 foci가 줄어들기 때문이다. [9] 따라서 γ-H2AX foci가 줄어드는 특징을 이용하면 방사선 민간도를 평가할 수 있다. 특정 세포의 γ-H2AX foci의수가 빨리 줄어들지 않는다면 해당 세포는 민감하다고 할 수 있다. [32]

제 4 절 γ-H2AX의 탈인산화

γ-H2AX의 탈인산화율의 차이는 방사선의 특성에 따른 생물학적 반응의 차이를 의미한다. DNA DSB가 수리되면 근처의 γ-H2AX 단백질은 탈인산화가 되고 foci의 수는 줄어들게 된다. [10] 탈 인산화의 특성을 통해서 DNA repair 능력을 평가할 수 있고 이는 세포의 방사선 민감성과 음의 상관관계를 가진다. [11, 12] 결국 동일한 세포에서의 γ-H2AX의 감소의 차이는 DNA damage의 복잡도를 의미한다. 여러 연구에서부터 복잡한 DSB의 손상의 회복율은 단순한 DSB의 손상 보다 작고 수리되지 않고 남아있는 DSB의 비율이 더 높음이 밝혀졌다. [33]

DNA DSB의 회복은 지수감소 형태의 함수를 따른다. [34] 함수는 2개의 지수항으로 이루어져 있는데 첫 번째 항은 fast repair 영역을 두 번째 항은 slow repair 영역을 의미한다. DNA DSB의 회복은 γ-H2AX foci의 감소와 직접적으로 연관되므로 γ-H2AX foci의 감소 또한 지수감소 형태의 함수로 분석할 수 있다. 최근 연구에서는 DNA DSB의 회복이 intermediate repair 영역을 포함한 3개의 지수 감소 항으로 이루어져 있다고 주장하였다. 해당 식은 식 (2.1) 과 같이 표현할 수 있다. [35]

Excess number of foci = $A_1 e^{\frac{t}{B_1}} + A_2 e^{\frac{t}{B_2}} + A_2 e^{\frac{t}{B_2}}$ (2.1)

여기서 t는 회복 시간 A, B는 상수이다. B는 DNA DSB 회복의 반감기와 직접적인 연관을 가지며, 각 repair 영역에서의 특성을 의미한다. A는 각 영역에서 회복되는 DSB의 비율을 의미한다. 만약 B가 매우 크면 DNA DSB의 회복은 매우 느리다. 그림 (2.4)에서는 DNA DSB의 회복과 지수 감소 함수로 fitting 모습을 보여준다. [35]



Figure 2.4 시간에 따른 손상된 DSB의 수리 후 남아있는 DSB의 비율. 시간 반응 함수는 지수 감소 형태를 이루며 NHEJ repair 방법의 결함이 있는 경우 정상 세포에 비하여 회복율이 느리다. [35]

제 3 장 대상 및 방법

제 1절 세포 및 세포 배양

본 연구에서, 실험은 Rat Diencephalon cells (DI TNC1) [Catalog No. CRL-2005, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA] 그리고 Rat Gliosarcoma cells (9L/lacZ) [Catalog No. CRL-2200, ATCC] 2종류에 대하여 수행하였다. 각각의 세포는 정상세포와 암세포에서의 방사선 반응 특성을 표현하기 위하여 선택하였다.

두 세포의 배지는 모두 90% Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) [Catalog No. SH30022.01, Hyclone, UT, USA] 과 10% Fetal Bovine Serum (FBS) [Catalog No. 30-2020, ATCC]의 혼합액을 사용하였다. 세포는 25-T flask 안에서 가습 상태의 37℃, 10% CO2 조건에서 배양되었다. 배양액은 세포의 건전성을 위해 일주일에 최소 3번 이상 교환해주었다. 조사 이틀 전에는 세포를 petri dish에 옮겨 배양하였다.

제 2 절 X선 조사

세포의 X선 조사는 서울대학교 원자핵공학과 방사선생명공학 연구실의 SNU-HARDX 시설을 이용하였다. [37] X선 조사 시설은 YXLON 450-D08 빔 튜브로 구성되었다. 본 실험에서 빔 튜브는 150kVp에서 1.25mA, 5mA, 15mA에서 작동하였다. Petri dish는 접시 변수를 제어하기 위해서 이용되었다. 해당 조건에서 X선 조사는 각각 일정한 선량률의 0.125Gy/min, 0.5Gy/min, 1.5Gy/min으로 이루어졌다. 각각의 선량률에 대해 0Gy 값을 포함하여 0.5Gy의 선량까지 0.1Gy 간격으로 실험을 진행하였다.



제 3 절 γ-H2AX 분석 실험

실험은 세포에 방사선을 조사한 후 인큐베이터에서 각각 1시간, 24시간 배양한 후에 진행하였다. 1시간은 DNA 손상에 대한 repair 기작이 반응하는데 필요한 시간을, 24시간은 DNA 손상의 repair 작용에 충분한 시간을 의미한다. 시간이 지나면 세포를 petri dish에서 떼어낸다. 약 100,000 개의 세포들을 얻어낸 후 세포를 cytocentrifuge [Catalog No. Rotofix 32A, Hettich, Tuttlingen, Germany] 로 원심분리 하여 슬라이드 글라스에 붙인다. 실험과정 동안의 시약 손실을 방지하기 위하여 슬라이드 글라스 위에 PAP 팬을 이용하여 소수성 장벽을 그려준다. 실험 과정 동안 세포의 손상 및 손실을 피하기 위하여 조심하여 샘플을 다뤄준다. 부착된 세포를 PBST, 0.05%의 tween 20 [Catalog No. T9100-010, GenDEPOT, TX, USA]을 포함한 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) [Catalog No. 14040-117, Glibco, Grand Island, NY, USA]을 이용하여 세척하고 4% Paraformaldehyde Solution을 이용하여 고정시킨다. 고정 후에는 세포를 ice-cold PBST로 2번 세척하고 1%의 Triton X-100 [Catalog No. T9500-010, GenDEPOT]을 포함한 PBS 수용액으로 10분간 항체가 세포 막을 통과할 수 있도록 투과화한다. 이후에는 PBST로 3번 세척해주고 10% bovine serum albumin (BSA) [Catalog No. A0100-010, GenDEPOT]을 포함한 PBST로 세포 상 다른 위치에 항체가 붙지 않도록 blocking 하여 항체가 specific 하게 반응 하도록 해준다. 만들어진 세포 샘플을 anti-γ-H2AX phosphor S139 항체 [Catalog No. Ab2893, Abcam, Cambridge, UK]와 1% BSA PBST 수용액을 이용하여 1시간 동안 염색한다. 염색 후에는 PBST로 3번 세척해주고 goat anti-rabbit IgG H&L fluorescein isothiocyanate 항체 [Catalog No. Ab6717, Abcam] 와 1% BSA PBST 수용액을 이용하여 암실에서 1시간 동안 2차 염색을 시켜준다. 면역 염색이 완료되면 PBST를 이용하여 3번 세척하여 주고 최종적으로 4'6-diamidino-2phenylindole in a fluoroshield mounting medium (DAPI) [Catalog No. Ab104139, Abcam] 로 염색한다. 완성된 샘플은 공기 방울이 생기지 않도록 커버 글라스를 덮어 보관한다. 하나의 데이터를 얻기 위하여 독립된 실험을 최소 3번 이상 수행하였으며, 각각의 실험에서 최소 800개 이상의 세포를 분석하였다.



Figure 2.6 본 실험에서 진행한 γ-H2AX 분석 실험의 단계 및 원리

제 4 절 Foci 이미지 분석

γ-H2AX foci 이미지는 형광 현미경 [Catalog No. BX53F, Olympus, Tokyo, Japan]의 40배율 렌즈 (40x UplanSApo]을 이용하여 관측하였다. γ-H2AX foci의 이미지의 분석 과정에서 형광의 세기나 형태가 계수에 큰 영향을 미치기 때문에, 형광 빛을 왜곡시킬 수 있는 외부 요소들을 최소화하였다. 정확한 계수를 위해, 다음의 3가지 기준을 설정하였다. 첫째, 분광 신호 분석 시 인과성이 확인되지 않는 pan-nuclear 신호를 제외한다. 둘째, 이미지의 γ-H2AX 신호 형광 profile을 서로 일치시킨다. 셋째, 깨끗한 형태와 균일한 크기를 갖는 핵들을 선별한다.

γ-H2AX foci의 수 (Foci per Cell, FPC)는 "CellProfiler" [version 2.1.1, Broad Institute's Imaging Platform, USA] 프로그램을 사용하여 분석하였다. 방사선 조사 후 나타난 FPC는 조사 후 FPC에서 대조군의 FPC를 빼주어 계산하였다. "CellProfiler"을 이용한 자동 계수 방법은 육안을 통한 분석과는 약 6.1 % 정도의 차이를 보였다. [31]

제 5 절 통계 분석

평균과 표준 오차는 최소 3번의 독립적인 실험 자료로부터 계산하였다. 각 실험 값의 표준 오차는 불확정도 전파(error propagation) 원리에 따라 최종 결과 값의 오차에 반영되었다. 측정량 X₁, X₂가 각각 다음과 같을 때:

> $X_1 = aA \pm bB$ (3.1) $X_2 = cA/B$ (3.2)

측정량의 오차는 아래와 같이 표현할 수 있다.

 $\sigma_{x_{1}} = \sqrt{a^{2}\sigma_{A}^{2} + b^{2}\sigma_{B}^{2} \pm 2ab\sigma_{AB}} \quad (3.3)$ $\sigma_{x_{2}} = X_{2} \times \sqrt{\frac{\sigma_{A}^{2}}{A^{2}} + \frac{\sigma_{B}^{2}}{B^{2}}} \quad (3.4)$

여기서 σ_X , σ_A , σ_B 는 각 X, A, B의 표준 편차를 의미하고 a, b, c 값은 비례상수이다. 본 실험에서는 조사 후 나타난 FPC의 오차를 구하는 단계에서 대조군의 오차를 포함하여 계산하였다.

제 4 장 실험 결과

방사선 방호 분야애서 저선량 방사선의 영향 평가는, 정상세포를 대상으로 하는 것아 타당하다. 본 연구를 위해 주 실험세포주로 선택한 Rat Diencephalon 정상세포가 실험치의 통계적 유의성이 부족하여 본 연구에서는 Rat Gliosarcoma 암세포로 실험을 먼저 진행하여 관측 자료의 특징을 이해하고 Rat Diencephalon 정상세포 실험을 후속으로 진행하는 것으로 계획하였다.

제 1 절 γ-H2AX Foci Formation of Gliosarcoma Cells

Rat gliosarcoma 세포를 대상으로 0.125, 0.5, 1.5 Gy/min의 선량률로 X선을 조사한 후 1시간과 24시간 동안 인큐베이터에서 배양한 후에 γ-H2AX Foci 분석을 진행하였다. Fig. 4.1과 4.2는 각각의 선량률에 대해 각각 1시간과 24시간 배양 후에 관찰한 γ-H2AX Foci 수가 선량에 따라 변화하는 것을 기록한 것이고 관찰량을 선량 증가에 따라 선형적으로 증가하는 관계로 fitting 하였다. 방사선 조사 후 1시간 경과 시 (Fig 4.1), 선량률이 클수록 선형적 fitting 선의 기울기가 증가하였다. 또한 세 개 선량률에서 모두, 0.1 Gy 선량 피폭 시 선형관계 수치를 초과하는 foci 수를 기록하였다. 최대 선량률인 1.5 Gy/min의 경우에는 0.2 Gy 피폭 시에도 선형관계 수치를 초과하는 foci 수를 기록하였다. 방사선 조사 후 24시간 경과 시에는 (Fig 4.2), 선량 증가에 따라 foci 수가 증가하였는데 선량률에 따른 차이가 관찰되지 않았다. 조사 후 1시간 경과 시점에서 0.1Gy 선량 준위에서 선형관계 수치를 초과하는 foci 가 계수되었던 것과 달리, 조사 후 24 시간 경과 후에는 0.1 Gy 준위에서의 foci 수치는 선량 관계 범위에 접근하였고 0.2 Gy 준위에서의 foci 수가 선형관계 수치를 초과하는 것으로 관찰되었다. Table 4.1에 선량률과 배양 시간에 따른 foci 수의 변화를 선형적으로 Fitting의 결과를 정리하였다.

요약하면, 저선량 구간에서 Foci의 발현 시점과 회복 시점에서 모두 HRS현상이 관측됨을 확인하였다. 또한 선량률이 클 때, 조사 후 1시간부터 24시간 경과에 따른 Foci 수 감소 정도가 커서 선량률이 높을 때 DSB 손상의 복구율이 큰 것을 확인하였다.



Figure 4.1 Excess numbers of γ -H2AX foci recorded 1h postirradiation in rat gliosarcoma at dose rates of (a) 0.125, (b) 0.5, (c) 1.5 Gy/min



Figure 4.2 Excess numbers of γ -H2AX foci recorded 24h postirradiation in rat gliosarcoma at dose rates of (a) 0.125, (b) 0.5, (c) 1.5 Gy/min

H2AX foci in rat gliosarcoma							
	1h		24h				
Dose Rate	Slope	R-square	Slope	R-square			
0.125 Gy/min	1.423	0.797	1.251	0.901			

0.939

0.819

2.638

3.123

0.885

0.616

1.556

1.210

0.5 Gy/min

1.5 Gy/min

Table 4.1 Statistical value of linear fitting for excess numbers of $\gamma-$ H2AX foci in rat gliosarcoma

제 2 절 Fractional Repair Rate of Gliosarcoma cells

DSB 손상 복구 효율을, 조사 후 경과 시간에 따른 foci 수의 변화를 근거로 하여, 아래식과 같이 '회복분률 (fractional repair ratio)'로 표현하였다.

Fractional Repair Ratio = $1 - \frac{Foci_{24h}}{Foci_{1h}}$ (4.1)

여기서, Foci_{1h}과 Foci_{24h}는 각각 조사 후 1시간과 24시간 경과 후 관찰된 foci 수이다.

Fig 4.3은 위의 식을 활용하여 3개 선량률에서 선량 별로 회복분율을 기록한 것이다. 해당 그래프에서 회복분율 값이 음수로 나타나는 구간이 존재하는데 이를 유의미한 정도의 DSB 감소가 확인되지 않은 것으로 해석하였다. 0.125 Gy/min 선량률로 0.2 Gy와 0.3 Gy 피폭의 경우와 [Fig 4.3 (a)] 0.5 Gy/min 선량률로 0.2 Gy 피폭의 경우가 이에 해당한다. 1.5 Gy/min의 선량률로 피폭 시 전 선량 구간(0.1 ~ 0.5 Gy)에서 유의미한 회복이 확인되었다.

요약하면, 저선량 (< 0.5 Gy) 피폭 시 유의미한 정도의 DSB 손상 복구가 진행되지 않는 선량 구간이 존재하고 이 구간은 선량률이 증가함에 따라 축소됨을 확인하였다.



Figure 4.3 DSB repair rates over time 1 to 24 h post-irradiation in rat gliosarcoma cells exposed to 0.1 to 0.5 Gy at dose rates of (a) 0.125, (b) 0.5, and (c) 1.5 Gy/min

제 5 장 논 의

제 1 절 HRS 현상과 DSB 회복 간의 관계

4.1 절과 4.2절에서 선량률과 선량이 높을수록 DSB의 회복분율이 높음을 확인하였다. 본연구의 관찰 결과는, DSB의 repair에 관여하는 단백질 중 하나인 pATM의 발현정도가 선량률과 선량에 따라 증가한다는 Nakamura et al.의 연구 결과와 일관성을 보인다. [39] 결론적으로, r-H2AX foci 수의 감소분율 즉, DSB 회복분율을 통해 HRS 현상을 분석하는 것의 타당성이 있다고 판단된다.

본 연구에서 유의미한 회복분율이 기록되지 않은 선량과 선량률 구간은, 타 연구에서 [21] HRS 현상을 관찰한 선량 구간과 유사하였다. 1.5Gy/min의 충분히 높은 선량률의 경우, 모든 선량 구간에서 유의미한 회복분율이 기록되었고 HRS 현상이 나타나지 않았다. 따라서, HRS 현상을 '저선량 구간에서 방사선에 대해 더욱 민감하게 반응하는 현상'으로 설명하기보다 '고선량 또는 고선량률 피폭 시 유발되는 DSB의 repair를 통한 세포생존율 회복이, 낮은선량과 낮은선량률 피폭 시에는 생성된 DSB의 repair가 효과적으로 진행되지 않아 낮은 세포생존률을 보이는 현상'으로 설명할 수 있다. 이와 같은 설명에 부합하는 기존의 실험 결과를 Fig. 5.2에서 제시하였다. [21]



Figure 5.1: Dose-response curves showing the numbers of normal cells with phosphorylated ATM after exposure to high-dose-rate(HDR: open symbols, 2 Gy/min) or low-dose-rate (LDR: closed symbols, 0.3 mGy/min) radiation. [39]



Figure 5.2 Occurrence of HRS phenomenon by DSB repair expression [21]

제 2 절 연구의 의문점 및 Foci 크기 분석

5.1 절에서, γ-H2AX foci 발현 수를 중심으로 HRS 현상과 DSB repair사이의 관계를 분석하고, HRS를 '낮은선량과 낮은선량률 피폭 시에 생성된 DSB의 repair가 효과적으로 진행되지 않아 낮은 세포생존률을 보이는 현상'으로 설명하였다. 그런데 본 연구에서 관찰한 Foci 관찰 자료가 HRS 현상의 설명에 부합하지 않는 부분이 있다.

첫째, 0.125 Gy/min과 0.5 Gy/min 선량률로 0.1 Gy 피폭 시, 그림 4.1(a)와 4.2(b)에서 본 바와 같이 조사 후 1시간 경과 시점에서 선량과의 선형적 관계를 초과하여 계수된 foci가 그림 4.2(a)와 4.2(b)에서 보는 바와 같이 조사 후 24 시간 경과 시점에서 고선량 피폭에 의한 foci 수와 선량에 비례하는 선형적 관계를 보인다. 즉, 0.1 Gy 피폭으로 발현된 foci 수가 감소했다는 것이고 이것은, 앞에서 HRS를 저선량 피폭 시 DSB repair가 효과적으로 진행되지 않은 결과로 설명한 것에 부합하지 않다.

둘째, 방사선 조사 후 1시간 경과 시 관찰 세포에서, 그림 4.1에서 보는 바와 같이 전체 선량 구간 (0.1 ~ 0.5 Gy) 중 최저 선량인 0.1 Gy (1.5 Gy/min 조사 시 0.2 Gy 포함) 피폭 준위에서 linear fitting 값보다 더 큰 값의 Foci의 수가 계수되었다. Stonina, D. et al이 1시간 배양 후에 관측된 Foci의 수가 선량에 선형적으로 비례하여 증가함을 보였는데, 이것은 foci 의 발현을 방사선 피폭으로 생성된 DSB에 대한 개별 반응으로 해석하는 근거가 될 수 있었다. [38] 본 연구의 관찰 내용은 앞의 해석에 어긋난다.

한편, 고선량률(1.5 Gy/min)에서 HRS를 배제한 앞의 설명에 부합하여 그림 4-3(c)에서 0.1 Gy와 0.2 Gy 에서 양의 회복분율을 보이고 있으나 그림 4-2(c)에서 보는 바와 같이 0.1 Gy, 0.2 Gy 선량에서 여전히 높은 값의 foci 수가 계수되고 있는 점에 대해서도 해석이 필요하다.

첫번째 문제에 대한 논의를 위해 Lee 등[31]의 foci 크기 분석 자료를 검토하였다. Fig 5.3은 본 연구와 동일한 세포에서 0.1 Gy 피폭 후 1시간 경과에서 관찰한 foci 크기 분포이다. Lee 등은 해당 논문에서 foci 크기를 DSB의 복잡성(complexcity)과 관련하여 설명하였다. 두 개의 SSB로 구성되는 단순한(simple) DSB에 비해 complex DSB는

DNA 손상 밀도가 크고 foci가 크게 관찰된다. 이러한 complex DSB의 경우 repair 효율이 단순한 DSB보다 낮다. [33] 따라서 Foci size 분포 분석을 통하여 전체 DSB 중 complex DSB의 비율을 추정해볼 수 있다.

Fig 5.4 는 본 연구에서 관찰한 foci를 선량률 별로 방사선 조사 후 1시간과 24시간 경과 시점에서의 크기 분포로 정리한 것이다. 1시간 경과 후 그래프의 모든 선량률 조건에서 0.2Gy와 0.5 Gy 사이의 가장 작은 크기의 Foci의 비율의 값은 큰 차이가 없다. Lee 등은 foci 크기 별 분포로부터 제일 작은 그룹과 네번째 작은 그룹을 각각 단순 DSB와 complex DSB에 해당하는 것으로 추정하였는데, 본 연구에서도1st /4th 그룹 간의 비율을 DSB의 복잡도와 연계하여 분석하였다. 즉, 비율이 낮을수록 복잡도가 큰 것으로 해석하였다. Fig 5.5는 1st /4th 그룹 간의 비율을 0Gy 값을 기준으로 정규화하여 나타낸 값으로 방사선 조사 후 1시간 경과 후의 선량, 선량률에 따라 DSB의 복잡도가 의미있는 경향성을 보이지는 않았다.

Fig 5.4의 24시간 경과 후 그래프는 선량이 증가할수록 가장 작은 크기의 Foci의 비율이 증가함을 보여준다. 동시에 선량률이 증가할수록 Foci 비율의 증가하는 정도가 감소하는 것도 관찰하였다. Fig 5.5의 24시간 경과 후 0.125 Gy/min의 선량율 조건에서는 선량이 증가할수록 DSB의 복잡도가 의미있게 감소하는 경향성을 관찰하였고 선량률이 커질수록 1시간의 그래프와 의미있는 차이를 보이지 않았다. Fig 5.6은 1시간 과 24시간 경과 후 Foci의 1st /4th 그룹 간의 비율의 차를 0Gy 값을 기준으로 정규화하여 나타낸 값으로 DSB의 repair 진행 동안의 복잡도 변화량을 의미한다. 선량이 높을수록 단순 DSB보다 complex DSB의 repair 효율이 높다는 것과 선량률이 높을수록 단순 DSB와 complex DSB의 전반적인 repair 효율이 높아 선량에 따른 차이가 미미함을 알 수 있다.

요약하면, 1시간과 24시간 사이의 DSB repair 과정에서의 complex DSB의 repair 효율이 방사선의 세포 영향 정도와 연관되어 있으며 선량이 높을수록 DSB repair 효율이 증가함을 관찰하였다.



Figure 5.3 The percent excess number distribution of γ -H2AX foci in different size groups for BEAS-2B cells exposed 0.1 Gy of alpha particles and X-rays [31]



Figure 5.4 Size distribution of γ -H2AX foci recorded 1 h (a, c, e) and 24 h (b, d, f) post-irradiation in rat gliosarcoma cells at dose rates of (a, b) 0.125, (c, d) 0.5, and (e, f) 1.5 Gy/min



Figure 5.5 Normalized 1st/4th size group fraction of γ -H2AX foci recorded 1h and 24h post irradiation in rat gliosarcoma cells at dose rates of (a) 0.125, (b) 0.5, and (c) 1.5 Gy/min



Figure 5.6 Normalized 1st/4th size group fraction difference of γ – H2AX foci recorded 1 h to 24 h post irradiation in rat gliosarcoma cells at dose rates of 0.125, 0.5, and 1.5 Gy/min

제 3 절 0.1 Gy 선량에서 DSB 회복율이 높은 원인

Hayes, D.P 에 의하면 X선에 의해서 약 20% 정도의 complex DSB가 발생할 수 있다. [40] Complex DSB 가 발생할 수 선량 구간에서 방사선 조사 후 1시간이 경과한 시점에서 Foci의 크기 분포가 선량과 선량률에 관계없이 유사하므로 complex DSB의 비율이 유사하다고 볼 수 있다. 한편, 선량이 증가하면 Foci의 수가 증가하고 따라서 complex DSB의 수도 선량에 따라 증가한다. Hayes, D.P에 따르면 complex DSB는 simple DSB의 repair를 방해하기 때문에 [40] 5.1절과 5.2절을 통해 확인한 선량, 선량률 요건의 범위 밖에서 DSB repair 효능이 완전하지 않은 경우 complex DSB의 수가 많은 수록 repair 효능이 떨어진다고 추정할 수 있다.

따라서, 특정 선량 값 (0.3 Gy) 이하에서 선량이 낮을수록 DNA repair 효능이 크다고 추정할 수 있다. 결론적으로 HRS 현상이란 complex DSB의 발현 정도와 DSB repair 효능의 관계 속에서 결정되는 회복 부재 구간으로 해석해 볼 수 있다.

제 4절 시간에 따른 HRS 피크 선량의 변화

1시간 시점의 Foci의 수가 linear fiittinng에 반해 높은 수를 기록하는 이유는 실험의 의도와는 달리 실험과정에서 발생하는 시간에 의해 Foci의 회복이 진행되기 때문일 가능성이 있다. 발현되는 DSB의 수는 선량과 선형적으로 비례하여 증가한다고 보는 것이 타당하다. 즉, DSB repair가 진행되기 전의 총 발현 foci의 수는 linear fitting을 따를 것이다. 그러나 방사선 조사 후 1h 경과 시점에서 관찰한 세포들에서는 이미 DSB repair가 진행 중이고 따라서 선량에 따라 선형적으로 증가하는 foci 수를 관찰하지 못하였을 수 있다. 본 논문에서 기술한 조사 후 1h의 배양 경과 시점은 방사선 조사 후 세포 배양 시간의 기록 개시 시점까지 약 한 시간의 실험 진행 소요 시간이 있어 실제로는 조사 후 2시간이 경과된 시점이다. 2 시간은 2012년 international journal of molecular medicine에 의하면 Fast repair 영역의 절반인 시간으로 충분한 simple DSB의 회복이 일어날 수 있는 시간이다. 따라서 2h 시점에서는 simple DSB의 repair 효과가 반영된 foci 수를 관측하는 것이 된다. 결국 0.1 Gy의 방사선 조사 후 1h, 24h 경과 시점에서 linear fitting 대비 높은 foci의 수를 보이는 이유는 고선량(>0.2 Gy) 피폭 후 2시간 경과 중에 단순 DSB의 repair가 많이 진행되는데 반해 저선량(0.1 Gy) 피폭 후 단순 DSB의 repair 효능이 낮은데 따른 것으로 해석해볼 수 있다.

한편, 2h 이후 complex DSB의 회복이 진행될 때에는 저선량(0.1 Gy) 피폭으로 생성된 complex DSB의 양이 적기 때문에 회복속도가 0.2 Gy에 비해 빠르게 나타난다고 추정할 수 있다. 0.2Gy 에서는 2h 이전에서 repair 효능이 조금 더 높아서 단순 DSB의 repair 속도가 높아 2h에서는 낮게 나타나나 2h 이후에서는 0.1 Gy 피폭 시보다 생성량이 많은 complex DSB가 낮은 repair 효능으로 인해 24h에 많은 수의 foci가 잔존하게 된다. 실제로 Ghardi et al에 따르면 4h 이후 저선량 구간에서 회복의 기울기가 꺾이는 모습을 확인할 수 있다. [41]



Figure 5.7 Kinetics of γ -H2AX foci formation in PBMCs analyzed by fluorescence microscopy. Time response curves represent the relative mean of γ -H2AX foci at different time points after irradiation. (A) Low and moderate doses (0.1, 0.25 and 0.5 Gy) or (B) high doses (1, 2 and 4 Gy) of X-irradiation. Error bars represent ± SEM (n=3). [41]

제 5 절 Rat Diencephalon Cell 분석

Fig 5.8 와 5.9 은 Rat diencephalon cell에 대하여 조사 후 1시간과 24시간이 경과한 후에 선량률에 따라 나타나는 γ-H2AX Foci의 수를 나타낸 그래프이다. 그래프는 gliosarcoma 세포와 유사하게 선량률이 증가할수록 foci의 수가 증가하고 llinear fitting 대비 더 높은 값을 보이는 선량 구간이 존재한다. Fig 5.10은 선량에 따른 fractional repair rate을 나타낸 그래프이다. Fig 5.10 (a) 0.3 Gy에서 유의미한 회복이 이루어지지 않았고 Fig 5.10 (b), (c) 경우 전구간에서 유의미한 회복을 보였다. 즉 일정 수준 이상의 회복이 일어나기 위한 선량률 값이 gliosarcoma 세포에 비하여 낮은 것을 알 수 있다. 이를 통하여 세포에 따라 HRS가 나타나는 선량값과 선량률 구간이 달라짐을 확인하였다. 그러나 현재 그래프 상으로는 2h 이후의 회복 능력을 평가하는데 Fig 5.6 에서부터 선량률에 따른 기울기의 차이가 크지 않았기 때문에 HRS 현상의 선량, 선량률 특성을 연구하기 위해 2h 이전의 회복 능력을 평가하는 추가 실험이 필요하다.



Figure 5.8 Excess numbers of γ -H2AX foci recorded 1h postirradiation in rat diencephalon at dose rates of (a) 0.125, (b) 0.5, (c) 1.5 Gy/min



Figure 5.9 Excess numbers of γ -H2AX foci recorded 24h postirradiation in rat diencephalon at dose rates of (a) 0.125, (b) 0.5, (c) 1.5 Gy/min



Figure 5.10 DSB repair rates over time 1 to 24 h post-irradiation in rat diencephalon cells exposed to 0.1 to 0.5 Gy at dose rates of (a) 0.125, (b) 0.5, and (c) 1.5 Gy/min

제 6 절 방사선 방호에서 가지는 의의

본 연구를 통해서 정상세포와 암세포 모두에서 특정 선량, 선량률 값 이하에 대해서 회복 능력의 부족으로 인해 HRS 현상이 일어남을 확인할 수 있었다. ICRP 35 (2005)에 따르면 저선량 방사선 구간인 100mSv 미만의 선량 구간에서도 암 발생의 위험이 존재한다. [1] 따라서 이 구간의 선량에서 발생 가능한 HRS현상을 근거로 저선량 방사선의 위해성을 제기할 수 있는지에 대한 논란이 있다. Hayes, D.P 와 Kim 은, HRS 현상은 회복되지 못한 세포의 apoptosis 발생에 따른 결과이므로 저선량 방사선 피폭에 대한 위해성을 과대평가할 여지는 없다고 밝혔다. [21,40] 그럼에도 불구하고 본 연구에서 DSB의 복잡도와 DSB repair 효능 정도를 HRS 현상의 주요 결정 요소로 평가하였기 때문에 회복이 잘 진행되지 못하는 선량/선량률 조건에서 DSB의 복잡도를 고려한 위해성의 판단이 필요하다고 생각된다.

제 7 절 방사선 치료에서 가지는 의의

방사선을 이용한 암 치료 시에 암세포에는 고선량의 피폭을 전달하고 정상세포에는 피폭을 최소화하기 위한 방법으로 분할 조사 기법이 사용되고 있다. [42] 실제로 통상적인 분할 조사는 일주일에 5번 2Gy의 선량을 암세포에 전달한다. 이러한 상황에서 정상세포에는 낮은 선량의 torrelance 피폭이 발생할 수 있다. 만약 이 때의 피폭 선량이 HRS 현상이 발생하는 피폭 선량이라면 정상세포의 사멸과 손상이 예상 보다 더 커질 수 있다. 본 연구를 통하여 HRS 현상이 발생하는 선량 보다 작을수록 회복이 효율적으로 일어날 수 있음을 확인하였다. 따라서 분할 조사 시 분할 횟수 등을 늘려 정상 세포에 대한 피폭 선량을 낮추는 방식으로 정상세포의 손상을 줄일 수 있다. 또한 고선량률의 방사선 조사 시 HRS 현상이 나타나지 않았으므로 선량률을 특정값 이상으로 제한함으로써 정상세포에 대한 영향을 최소화할 수 있다.

제 8 절 연구의 정확성 및 추가 실험 논의

본 연구에서 몇 개의 요소들이 결과의 정확성의 오차를 유발하였다. 첫 번째는 DSB 생성의 내제적 변동성이다. DNA DSB는 방사선에 의해서만 발생하는 것이 아닌 세포분열 과정에서 자연적으로 발생하기도 한다. 본 연구에서 대조군(0 Gy)의 Foci 수는 세포 당 약 0.8~1.5 개 이었다. 저선량 피폭 조건에서 방사선에 의한 Foci의 수는 작은 수를 가지기 때문에 대조군의 변동성에 따른 실험 결과의 오차는 상대적으로 크다. 또다른 오차의 요소로는 Foci 이미지의 형광 세기이다. 이미지의 형광 세기(밝기)는 Foci의 계수에 영향을 준다. 이러한 영향을 최소화하기 위해 본 연구 수행 시 암실을 설계하고 각 foci 이미지들의 평균 형광 세기 및 분포를 모든 조건에서 유지하였습니다. (??) 무엇보다도, 연구의 재현성 측면에서 γ-H2AX Foci 이미지를 분석하는 방법이 준화되는 것이 중요한데 재현성을 확보를 위해 신호를 분석하는 방법을 표준화 하거나 각 분석 방법에 대한 초점 특성을 정량적으로 확인하여 새로운 기준을 확립할 필요가 있다.

연구 결과의 신뢰성을 확보하고 연구의 발전을 위한 추가적인 실험도 필요하다. 첫째, Diencephalon Cell의 오차를 줄이기 위한 추가적인 실험이 필요하다. 본 연구 결과에서는 Diencephalon의 오차가 크게 나타나 정량적인 분석이 어려웠다. 둘째, 방사선 조사 후 24시간 경과 한 Foci의 크기 분포를 바탕으로 하는 Complex DSB의 repair 효능을 평가하는 기준을 명확히 해야한다. 마지막으로, DSB의 repair 효능에 더해 세포의 DSB 발생 감지능을 추가 인자로 도입하여, 저선량 방사선의 영향을 평가하는 실험을 진행할 필요가 있다. Słonina, D. et al.은 γ-H2AX Foci의 발현 정도는 DSB의 인식과도 연관 됨을 확인하였습니다. [38] 실제로 시뮬레이션 등의 결과에 의하면, 선량률과 관계없이 선량에 따라 DSB의 반응은 선형적이기 때문에 DSB 인식율을 새로운 분석 요소로 하여 HRS 현상의 정량화 모델을 개발할 수 있을 것으로 생각된다.

제 6 장 결 론

저선량 방사선의 위해성에 대한 연구는 많이 이루어지고 있지만 아직 명확한 결론이 나지 않았다. 저선량 방사선 위해성 평가에서 HRS 현상의 메커니즘은 중요한 연구과제이며 본 연구에서도 이를 주제로 하여 HRS 현상을 연구하고자 하였다. 과거 HRS 현상과 방사선 선량률과의 관계를 세포 생존율 관점에서 분석하여 관계를 규명한 연구가 있었는데, 선량률이 특정 값 이상일 때 HRS 현상이 관찰되지 않은 것에 대해 선량률이 증가함에 따라 회복기작의 발현 정도가 높아지기 때문이라고 설명하였다. 이에 따라 본 연구에서는 γ-H2AX 분석을 이용하여 HRS 현상의 선량률 효과를 DSB의 회복관점에서 연구하였다. DSB의 복잡도가 세포의 사멸의 큰 영향을 주는 조건이기 때문에 DSB의 복잡도를 확인하는 분석도 필요하였다. 결과적으로 본 연구를 통해 Foci의 크기를 관찰점으로 하여 DSB의 복잡도와 HRS 현상 간의 관계를 추정할 수 있었다.

본 연구의 결론은:

1. HRS 현상이란 선량과 선량률이 특정 값 보다 작을 때, 유의미한 회복이 일어나지 못하여 많은 세포들이 사멸되다가 선량이 증가함에 따라 세포 회복 기작의 발현 정도가 증가하여 세포 사멸이 줄어드는 현상이다.

2. DSB의 회복 기작의 발현 정도는 선량, 선량률, DSB의 복잡도에 의해 결정된다. 선량, 선량률이 높을수록 DSB의 회복 기작의 발현정도가 높아진다. 회복 기작의 발현정도가 낮은 경우에는, complex DSB의 수가 DSB repair 효능을 결정하는 주요한 요소가 되고 낮은 선량에서는 complex DSB의 생성 수가 작다. 따라서 0.1 Gy의 낮은 선량에서 회복이 잘 이루어진다고 추정할 수 있었다.

3. 암세포인 Rat Gliosarcoma cell 과 정상세포인 Rat Diencephalon Cell 모두에서 HRS 현상이 관측되고 선량, 선량률, complex DSB의 수에 의한 회복기작의 발현 정도의 차이가 발생하였다.

4. 암세포인 Rat Gliosarcoma cell 보다 정상세포인 Rat Diencephalon Cell에서 일정 수준의 회복기작을 발생하기 위한 선량값은 높고 선량률 값은 낮았다.

본 연구를 통하여 HRS 현상에서의 선량률의 효과를 DSB의 회복관점에서 해석할 수 있었다. 또한 DSB의 복잡도도 HRS 현상에서의 회복 구간을 결정할 수 있는 주요 인자가 될 수 있음을 확인하였다. 이를 토대로 회복이 잘 진행되지 못하는 선량/선량률 조건에서 DSB의 복잡도를 고려한 위해성의 판단이 필요함을 제안하였고 암 치료를 위한 방사선 분할 조사 시에도 정상세포의 손상을 방지하기 위해 더 많은 횟수의 분할 조사를 통하여 피폭 선량을 줄이거나 HRS 현상이 발생하지 않는 선량률의 선택을 제안하였습니다.

본 연구 결과의 신뢰성을 확보하고 연구의 발전을 위한 추가적인 실험도 필요하다. 방사선 조사 직후, 조사 후 4시간 이전과 이후를 구분하여 HRS 현상과 DSB의 복잡도 간의 관계를 규명해야 한다. 또한 본 연구에서는 다루지 못한 DSB 인식율을 새로운 분석 요소로 하여 HRS 현상의 정량화 모델 개발을 위한 연구도 진행되어야 한다. 1. Valentin, J. Low-dose extrapolation of radiation-related cancer risk. Ann ICRP 35, 1-140, doi:10.1016/j.icrp.2005.11.002 (2005).

2. Marples, B. & Joiner, M. The response of Chinese hamster V79 cells to low radiation doses: evidence of enhanced sensitivity of the whole cell population. Radiation research 133, 41–51 (1993).

3. Marples, B. & Collis, S. J. Low-dose hyper-radiosensitivity: past, present, and future. International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics 70, 1310-1318 (2008).

4. West, C. M. et al. Molecular markers predicting radiotherapy response: report and recommendations from an International Atomic Energy Agency technical meeting. International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics 62, 1264-1273 (2005).

5. Krueger, S., Joiner, M., Weinfeld, M., Piasentin, E. & Marples, B. Role of apoptosis in low-dose hyper-radiosensitivity. Radiation research 167, 260-267 (2007).

6. Martin, L. M., Marples, B., Lynch, T. H., Hollywood, D. & Marignol, L. Exposure to low dose ionising radiation: molecular and clinical consequences. Cancer letters 338, 209-218 (2013).

7. Słonina, D., Biesaga, B., Urbański, K. & Kojs, Z. Low-dose radiation response of primary keratinocytes and fibroblasts from patients with cervix cancer. Radiation research 167, 251-259 (2007).

8. Joshi, G. S., Joiner, M. C. & Tucker, J. D. Cytogenetic characterization of low-dose hyper-radiosensitivity in Cobalt-60 irradiated human lymphoblastoid cells. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 770, 69-78 (2014).

9. Rothkamm, K. & Horn, S. gamma-H2AX as protein biomarker for radiation exposure. Ann Ist Super Sanita 45, 265-271 (2009).

10. Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L. H. & Lo[°]brich, M. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. Molecular and cellular biology 23, 5706-5715 (2003).

11. Menegakis, A. et al. Prediction of clonogenic cell survival curves

based on the number of residual DNA double strand breaks measured by γ H2AX staining. International journal of radiation biology 85, 1032-1041 (2009).

12. Banáth, J. P., Klokov, D., MacPhail, S. H., Banuelos, C. A. & Olive, P. L. Residual γ H2AX foci as an indication of lethal DNA lesions. BMC cancer 10, 1–12 (2010).

13. Wykes, S., Piasentin, E., Joiner, M., Wilson, G. & Marples, B. Low-dose hyper-radiosensitivity is not caused by a failure to recognize DNA double-strand breaks. Radiation research 165, 516-524 (2006).

14. Colin, C. et al. MRE11 and H2AX biomarkers in the response to low-dose exposure: balance between individual susceptibility to radiosensitivity and to genomic instability. International Journal of Low Radiation 8, 96–106 (2011).

15. Simonsson, M. et al. Low-dose hypersensitive γH2AX response and infrequent apoptosis in epidermis from radiotherapy patients. Radiotherapy and Oncology 88, 388-397 (2008).

16. Chadwick, K. & Leenhouts, H. in The Molecular Theory ofRadiation Biology25-50 (Springer, 1981).

17. Marples, B., Lam, G., Zhou, H. & Skov, K. The response of Chinese hamster V79-379A cells exposed to negative pi-mesons: evidence that increased radioresistance is dependent on linear energy transfer. Radiation research 138, S81-S84 (1994).

18. Schettino, G. et al. Low-dose hypersensitivity in Chinese hamster V79 cells targeted with counted protons using a charged-particle microbeam. Radiation research 156, 526-534 (2001).

19. Dionet, C. et al. Effects of low-dose neutrons applied at reduced dose rate on human melanoma cells. Radiation Research 154, 406-411 (2000).

20. Tsoulou, E., Baggio, L., Cherubini, R. & A. Kalfas, C. Radiosensitivity of V79 cells after alpha particle radiation at low doses. Radiation protection dosimetry 99, 237-240 (2002).

21. 김건민. "저선량 x 선 피폭 시 과민감성 현상에 대한 방사선 선량률의 영향성 연구." 국내석사학위논문 서울대학교 대학원, 2017. 서울 22. Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A. & Gorbunova, V. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. Cell cycle 7, 2902–2906 (2008).

23. Wang, H. & Xu, X. Microhomology-mediated end joining: new players join the team. Cell & bioscience 7, 1-6 (2017).

24. Bonner, W. M. et al. $\gamma H2AX$ and cancer. Nature Reviews Cancer 8, 957–967 (2008).

25. Bakkenist, C. J. & Kastan, M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. Nature 421, 499-506 (2003).

26. Pilch, D. R. et al. Characteristics of γ -H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. Biochemistry and cell biology 81, 123-129 (2003).

27. Rothkamm, K. & Löbrich, M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. Proceedings of the National Academy of Sciences 100, 5057-5062 (2003).

28. de Feraudy, S., Revet, I., Bezrookove, V., Feeney, L. & Cleaver, J. E. A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of γ H2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks. Proceedings of the National Academy of Sciences 107, 6870-6875 (2010).

29. Truong, L. N. et al. Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. Proceedings of the National Academy of Sciences 110, 7720-7725 (2013).

30. Obe, G. Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health. (2007).

31. Lee US, Lee DH and Kim EH. "Characterization of γ -H2AX Foci Formation under Alpha Particle and X-ray Exposures for Dose Estimation." Scientific Reports 12: 3761 (2022).

32. MacPhail, S. et al. Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. International journal of radiation biology 79, 351-359 (2003).

33. Antonelli, F. et al. Induction and repair of DNA DSB as revealed

by H2AX phosphorylation foci in human fibroblasts exposed to lowand high-LET radiation: relationship with early and delayed reproductive cell death. Radiation research 183, 417-431 (2015).

34. Dikomey, E. & Lorenzen, J. Saturated and unsaturated repair of DNA strand breaks in CHO cells after X-irradiation with doses ranging from 3 to 90 Gy. International journal of radiation biology 64, 659-667 (1993).

35. McMahon, S. J., Schuemann, J., Paganetti, H. & Prise, K. M. Mechanistic modelling of DNA repair and cellular survival following radiation-induced DNA damage. Scientific reports 6, 1-14 (2016).

36. Thomas, C. et al. Impact of dose-rate on the low-dose hyperradiosensitivity and induced radioresistance (HRS/IRR) response. International Journal of Radiation Biology 89, 813-822 (2013).

37. Lee, K.-M., Kim, S.-R. & Kim, E.-H. Characterization of dose delivery in a hard X-ray irradiation facility. Journal of nuclear science and technology 49, 655-661 (2012).

38. Słonina, D. et al. Low-dose hypersensitive response for residual pATM and γH2AX foci in normal fibroblasts of cancer patients. International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics 100, 756-766 (2018).

39. Nakamura, H. et al. DNA Repair Defect in AT Cells and their Hypersensitivity to Low-Dose-Rate Radiation. Radiation Research 165, 277-282, doi:10.1667/rr3519.1 (2006).

40. Hayes, D. P. Non-Problematic Risks from Low-Dose Radiation-Induced DNA Damage Clusters. Dose-Response 6, 30-52, doi:10.2203/dose-response.07-023.Hayes (2008).

41. Ghardi, M., Moreels, M., Chatelain, B., Chatelain, C. & Baatout, S. Radiation-induced double strand breaks and subsequent apoptotic DNA fragmentation in human peripheral blood mononuclear cells. International journal of molecular medicine 29, 769-780 (2012).

42. Teh, B. S., Woo, S. Y. & Butler, E. B. Intensity modulated radiation therapy (IMRT): a new promising technology in radiation oncology. The oncologist 4, 433-442 (1999).

Abstract

Study on the Low Dose Hyper-Radiosensitivity through γ-H2AX Foci Analysis

Kim Tae Kyu Department of Nuclear Engineering The Graduate School Seoul National University

The research about risk of low-dose radiation exposure is an important challenge in the field of radiation protection and treatment over a long period of time. The ICRP recommends using the LNT model to assess the low dose impact. However, contrary to LNT model, biological characteristics of low-dose radiation have been found, and research on the effect of low-dose radiation is still being actively conducted. Among them, a Hyper Radio Sensitivity (HRS) phenomenon was observed in the low-dose region (<0.3Gy) showing a lower cell survival probability than predicted based on the LNT model. Many studies have been conducted on the mechanism of HRS phenomena, but the interpretation between DNA repair and HRS phenomena has not been clearly discussed. Therefore, in this study, y-H2AX foci analysis was conducted to evaluate radiation-induced DSB, and through this, a study was conducted to confirm the relationship between HRS phenomenon and DSB expression and repair.

At the dose rates of 0.125, 0.5, and 1.5 Gy/min, the number of foci

exceeding the linear relationship value was recorded 1 hour after irradiation for Rat gliosarcoma cells at 0.1 Gy dose exposure. After 24 hours, the number of foci exceeding the linear relationship value was recorded at 0.2 Gy dose exposure. Through this, it was confirmed that the HRS phenomenon was observed at both the time of Foci's expression and repair in the low-dose section. In addition, when the dose rate was large, the degree of decrease in the number of Foci over 1 hour to 24 hours after irradiation was large, so it was confirmed that the repair rate of DSB damage was large when the dose rate was high. Additionally, the repair efficiency of the DSB was calculated. 0.125 Gy/min dose rates showed no significant repair of DSB for 0.2 Gy and 0.3 Gy exposures whereas 1.5 Gy/min dose rates showed significant repair in the entire dose interval (0.1)to 0.5 Gy) for exposures. In summary, it was confirmed that there was a dose interval in which no significant degree of DSB repair was performed during low dose (< 0.5 Gy) exposure, and this interval was reduced as the dose rate increased. Finally, the Foci size distribution analysis was conducted to discuss the reason for significant repair from 0.1 Gy exposure. As a result, it was confirmed that complex DSB was involved in DSB repair 2 hours after irradiation, and it was estimated that the absolute number of complex DSB was affecting the DSB repair.

In this study, unlike the commonly known fact that the HRS phenomenon overreacts to radiation in low-dose regions, the HRS phenomenon is described as a phenomenon in which significant repair does not occur when dose and dose rates are less than certain values. In addition, it was confirmed that the degree of expression of the repair mechanism of DSB is determined by the dose, dose rate, and complexity of DSB.

Through this study, the complexity of DSB was mentioned as a factor determining the HRS phenomenon, suggesting that it is necessary to judge the risk considering the complexity of DSB under dose/dose rate conditions in which repair does not proceed well. Finally, it was suggested that it is necessary to consider the HRS phenomenon when planning radiation therapy for cancer treatment.

Keywords : Low dose radiation, HRS phenomena, DSB repair, γ -H2AX analysis, γ -H2AX dephosphorylation, γ -H2AX foci size analysis, DSB complexity, Student Number : 2020-26515