

学位論文

特性遠赤外線照射による癌細胞の動態に関する研究

細川 浩良

キーワード：遠赤外線，癌，熱ショック蛋白質

The Dynamic Phase of Cancer Cells by the Low Temperature Narrow Wavelength Far Infrared Radiation

Hiroyoshi HOSOKAWA

Abstract : Far infrared ray (FIR) are known to have some effects on the human body, but little is known about the non-fever effects in normal thermal fields. We developed a CO₂ incubator and an animal raiser that is able to radiate low temperature narrow wavelength (limited) FIR at wavelength of 4 to 20μm with a peak wavelength 7 to 12μm, which had strong effects on living tissue, and we investigated the effects of this FIR on cancer cells.

In *in vitro* analyses, analyses of cell proliferation and cell cycle were carried out using 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) incorporation and flowcytometry in three cancer cell lines: the human vulval epidermal cell line A431, the human tongue squamous cell carcinoma (SCC) line HSC3, and the human gingiva SCC line Sa3. In addition, from the viewpoint of the heat shock proteins (HSPs), especially the HSP70 protein, having cytoprotection for various stresses, *Hsp70A* gene expression was examined using real-time reverse transcription polymerase chain reaction. The effect of HSP70 protein on cell proliferation for limited FIR was analyzed by transfecting *Hsp70A* expression vector or by repressing *Hsp70A* and *Hsp70C* mRNA using gene silencing methods with siRNA.

In *in vivo* analyses, we generated xenograft tumors of A431 and Sa3 cells and examined the changes of tumor volume, genetic alteration and histological observation.

As a result, limited FIR suppressed cell proliferation of HSC3 and Sa3 cells, not A431 cells. The cell cycle of HSC3 cells was mainly delayed by limited FIR in the G2/M stage, while necrotic cells of Sa3 cells slightly increased by limited FIR. Moreover, the expression of *Hsp70A* gene and HSP70 protein was higher on A431 cells whose cell proliferation was not suppressed by limited FIR. On BrdU incorporation analysis under the condition in which HSP70 protein was repressed, BrdU incorporation of A431 cells was suppressed. In *in vivo* analyses, limited FIR suppressed both the growth of A431 tumor and Sa3 tumor. Tumor tissues of A431 in limited FIR group were encapsulated and matrix metalloproteinase (MMP)-1, -9, -10, -13 were significantly suppressed in the protein level. On the other hand, limited FIR induced the apoptosis in the Sa3 tumor.

These findings *in vitro* suggest that limited FIR suppressed the proliferation of certain cancer cells, and the suppressive effect depended on expression level of HSP70 protein. These findings *in vivo* that limited FIR suppressed the tumor growth of A431 by inhibiting MMPs, and that of Sa3 by inducing apoptosis.

緒 言

遠赤外線 (Far Infrared Ray, FIR) は、波長域が 4 ~ 1000 μm の電磁波で、高温域で照射することにより身体深部体温の上昇を認め、血行を促進する効果のあることが認められている¹⁻³⁾。特に、4~20 μm の遠赤外線は、糖や蛋白質、脂質などの生体高分子を形成する分子結合の共鳴波長であり、容易に生体高分子によって吸収され、さらに得られた分子振動のエネルギーは一部熱に変換される^{4, 5)}。また、ある種のセラミックスやミネラルは遠赤外線を放射するため、幅広く放射熱源として利用されているが、温度源の上昇によりこれらセラミックスやミネラルから放射される遠赤外線の最大放射ピーク波長がより低い波長域にシフトすることが分かっている⁶⁾。

遠赤外線の全身照射に関する研究では、波長域 4 ~ 25 μm の遠赤外線を 23 ~ 25 °C で照射すると、自然乳癌高発系 SHN マウスの流産の発生率が抑制され、出生率が高まる一方で、成長速度が低下し、副腎と精巣および下垂体前葉の萎縮がみられたとの報告がある⁷⁾。また、ラットを用いた研究では、遠赤外線照射により成長および創傷治癒が促進されることや、睡眠調節を担っていることが報告されている^{3, 8, 9)}。さらに、ヒトを用いた研究では、遠赤外線照射により皮膚血流の増加や体温上昇、また乳汁の分泌が促進されるなどの効果を有することが報告されている^{2, 3, 10)}。また、遠赤外線と癌に関する研究では、高温域 (35 ~ 41 °C) での遠赤外線全身温熱療法により SHN マウスの乳癌の増殖が抑制され^{11, 12)}、その増殖抑制効果はグルコース^{13, 14)} やコーヒー・チエリー¹²⁾ の投与と併用することで高まったとの報告がある。このように、高温域における温熱療法は現在、癌細胞が温熱に弱いこと、すなわち癌細胞が正常細胞に比べ温熱に強い感受性を有する点から幅広く癌治療に応用されている¹⁷⁻²⁰⁾。一方、常温域 (26 ~ 27 °C) での遠赤外線照射においても、SHN マウスの乳癌の増殖が抑制されることおよび下垂体前葉重量の減少や血中レプチンの低下がみられることが報告され^{15, 16)}、また最近、波長域 4 ~ 16 μm の遠赤外線を放射する竹炭粉末を培養ディッシュの下に配置することにより、湿度 100%， 37.0 °C， 5% CO₂， 95% 空気の気相下で HeLa 細胞の増殖を抑制することが報告された⁵⁾。しかしながら、常温域での遠赤外線照射による細胞レベルおよび個体レベルの腫瘍増殖抑制効果の機序については十分には解明されていない。

現在、遠赤外線の明確な効果が明らかにされていない理由は、一定温度下で遠赤外線を効率よく照射する細胞培養装置および動物飼育装置が開発されていないためと考えられる。そこで本研究では、生体から放射され、かつ生体に吸収される 7 ~ 12 μm にピークを有する波長域 4 ~ 20 μm の遠赤外線（以下、特性遠赤外線と略記する）を照射可能な細胞培養装置 (37 °C) と動物飼育装置 (23 ~ 28 °C) を使用して、特性遠赤外線照射が癌細胞に与える影響について *in vitro* 及び *in vivo* において検討を行った。

材料および方法

1. 特性遠赤外線照射細胞培養装置

本研究で使用した特性遠赤外線照射細胞培養装置は、扉面を除く全面に配置した炭素、ケイ素、酸化アルミナ、二酸化チタンでコーティングしたパネル（以下、特性遠赤外線放射パネルと略記する）に 40 °C の電熱を与えることにより波長域 4 ~ 20 μm (ピーク, 7 ~ 12 μm) の特性遠赤外線（照射効率 97% 以上）を湿度 100%， 37.0 °C， 5% CO₂， 95% 空気の気相下に細胞培養することができます。また、装置内の培養棚は、同様な組成のセラミックスでコーティングされたものを使用した（図 1 A, 1 B）。

2. 特性遠赤外線照射動物飼育装置

本研究で使用した特性遠赤外線照射動物飼育装置は、扉面を除く全面に配置した特性遠赤外線照射パネルを紫外線 (ultraviolet ray; 以下 UV と略記する) ランプで 40 °C に加温することにより波長域 4 ~ 20 μm (ピーク, 7 ~ 12 μm) の特性遠赤外線（照射効率 97% 以上）を照射することができます。また、チャンバー内部の温度を、15 ~ 37 °C の範囲で調節することができ、UV と二酸化チタンフィルターを利用した光触媒作用により、常に無菌エアーチャンバー内部に循環させることにより、快適にマウスを飼育することができる（図 1 C, 1 D）。実験中、特性遠赤外線を照射する上部チャンバーは 23.5 ~ 28.4 °C に、特性遠赤外線を照射しない下部チャンバーは 23.6 ~ 27.0 °C に維持された。

3. フーリエ変換赤外分光光度計（以下、FTIR と略記する）による特性遠赤外線放射セラミックスの解析法

本研究で使用した炭素、ケイ素、酸化アルミナ、二酸化チタンを含有した遠赤外線放射セラミックスの各波長域における分光放射輝度を FTIR JIR-5500 (日本電子、東京) および赤外放射測定ユニット IR-IRR200 (日本電子、東京) を用いて測定を行った。遠赤外線照射セラミックスの試料温度は 40 °C で、波長域 4.5 ~ 20 μm の範囲で測定を行った（図 2）。解析データは、5 回の測定の平均から算出した。

本研究で用いた 7 ~ 12 μm にピークを有する遠赤外線は、空気や 3 μm および 6 μm 付近に吸収スペクトルを有する水を透過することができ¹⁾、また、0.7 mm 厚のポリスチレン製培養ディッシュで約 90% のエネルギーが吸収された後、約 10% の遠赤外線エネルギー（約 550 μW/cm²）が照射される⁴⁾ 条件下に実験を行った。

4. 細胞および培養法

本研究では、ヒト外陰部扁平上皮癌細胞株 A431 細胞、ヒト舌扁平上皮癌細胞株 HSC3 細胞、ヒト歯肉扁平上皮癌細胞株 Sa3 細胞を用いた。A431 細胞は、10% (容量 /

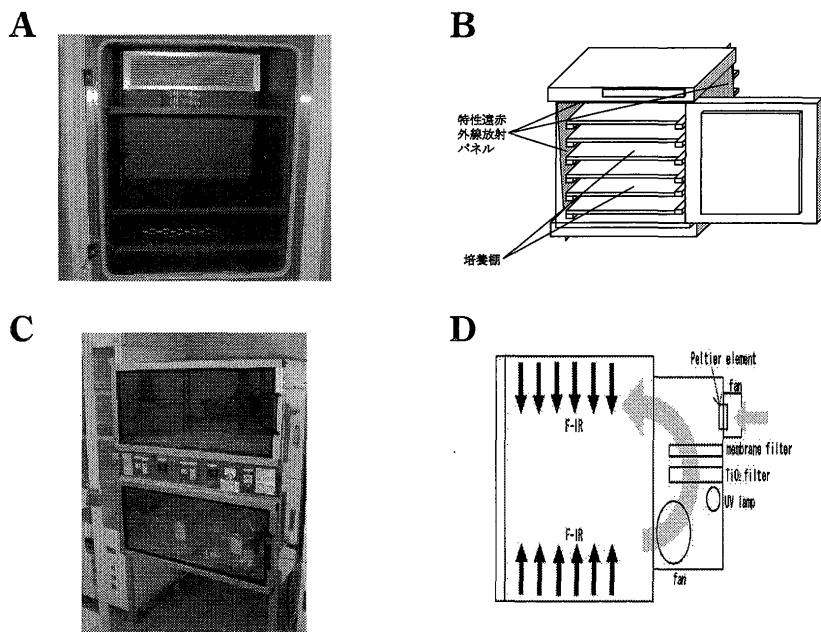


図1 特性遠赤外線照射細胞培養装置

(A) 装置全体像 (B) 装置見取り図。扉面を除く全面に配置した炭素、ケイ素、酸化アルミナ、二酸化チタンでコーティングした遠赤外線照射パネルに40 °Cの電熱を与えることにより波長域4~20 μm(ピーク、7~12 μm)の特性遠赤外線(照射効率97%以上)を湿度100%，37.0 °C，5%CO₂ 95%空気の気相下に細胞培養することができる。また、培養棚も同様な組成のセラミックスでコーティングされている。

特性遠赤外線照射動物飼育装置

(C) 装置全体像 (D) 装置見取り図。扉面を除く全面に配置した遠赤外線照射パネルをUVランプで40 °Cに加温することにより特性遠赤外線を23.5~28.4 °Cの温度域で照射することができる。また、UVランプと二酸化チタンフィルターを利用した光触媒作用によりチャンバー内部に滅菌エアーを循環させることができる。

容量、以下v/vと略記する)牛胎児血清、100 μg/mlストレプトマイシン(GIBCO BRL, Rockville, USA)、100 U/mlペニシリン(GIBCO BRL)を含むDMEM/HamF-12培地(Sigma, St. Louis, USA)を、HSC3およびSa3細胞は、10%牛胎児血清、100 μg/mlストレプトマイシン(GIBCO BRL)、100 U/mlペニシリン(GIBCO BRL)を含むBasal Eagle's培地(Sigma)を用いた。

すべての培養は、5%CO₂ 95%空気の気相下、37 °Cを行い、培養液は3日毎に交換した。

5. 細胞増殖能の検討

24穴ディッシュ(Nunc, Roskilde, Denmark)に5.0×10⁴個の細胞を播種し、播種直後から特性遠赤外線の照射を行い、2, 4, 8, 10日目における生細胞数を0.3%トリパンブルー(和光純薬、大阪)を用いた色素排除法にて測定した。

6. terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling(以下TUNELと略記する)法によるアポトーシスの検出

35 mmディッシュ内の円形シート(日新EM、東京)上で培養したA431, HSC3, Sa3細胞を7日間特性遠

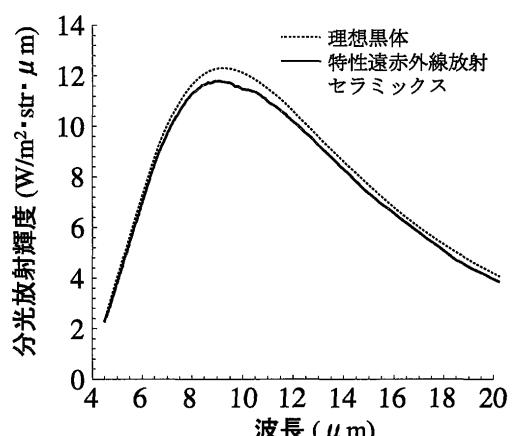


図2 フーリエ変換赤外分光光度計による特性遠赤外線放射セラミックスの分光放射輝度曲線

炭素、ケイ素、酸化アルミナ、二酸化チタンを含有した特性遠赤外線放射セラミックスの各波長域における分光放射輝度をFTIRを用いて測定を行った。特性遠赤外線放射セラミックスの試料温度は40 °Cで、波長域4.5~20 μmの範囲で測定を行った。理想黒体の分光放射輝度に対する特性遠赤外線放射セラミックスの分光放射輝度すなわち放射効率は97%以上で、分光放射輝度10 W/m²·str·μm以上を示す波長域は、7.2~12 μmであった。

赤外線照射し、アポトーシスの検出は TUNEL 法により Apo-BrdU In Situ DNA Fragmentation Assay Kit (Biovision, CA, USA) を用いて行った。円形シートは、30分間 4 % ホルマリン/PBS(-)にて固定後、37 °C 1 時間 DNA labeling solution にて処理を行い、PBS(-)にて洗浄後、抗 BrdU-FITC 抗体で室温30分間反応させた。さらに、円形シートを PI/RNase Staining Buffer にて染色を行った。また、ポジティブコントロールとしてトランスイルミネーター TFX-20.M (家田貿易、東京) を用いて 7,200 μW/cm² の UV (波長312 nm) を 5 分間照射したもの用いた。アポトーシス細胞の観察は、蛍光顕微鏡 (OLYMPUS,BX51, Tokyo, Japan) にて行い、無作為に選んだ10視野よりアポトーシス陽性細胞率を求めた。

7. 5-bromo-2'-deoxy-uridine (以下 BrdU と略記する) 取り込み能の検討

BrdU 取り込み能の検討は、BrdU labeling and detection kit III (Roche, Mannheim, Germany) を用いて添付プロトコールに従って行った。1 × 10⁴ 個の細胞を 96 穴ディッシュに播種、4 日間培養し最終濃度 10 μM 濃度にて培養液中に BrdU を添加し、37 °C で 4 時間培養した。固定、抗体反応、洗浄の過程を経て、プレートリーダーを用いて解析した。

8. Annexin V-propidium iodide 二重染色法による壊死細胞の検出

特性遠赤外線照射による癌細胞の壊死細胞数の定量は、Annexin V-FITC Kit (Bender MedSystems, Vienna, Austria) を用いて行った。6 穴プレートに 2 × 10⁵ 個の細胞を播種した直後から特性遠赤外線照射を48時間行い、細胞を PBS にて洗浄後、1 × binding buffer を添加し、さらに 5 μl FITC 標識 Annexin V および 10 μl PI (最終濃度 1 μg/ml) を添加した。室温、遮蔽下で 5 分間反応後、FACS にて検出した。その際、Annexin V 陰性 / PI 陽性を壊死細胞、Annexin V 陽性 / PI 陽性を後期アポトーシス、Annexin V 陽性 / PI 陰性を初期アポトーシス細胞とした。

9. 細胞周期解析

1 × 10⁶ 個の細胞を 60 mm ディッシュに播種した後、double thymidine block 法を用いて細胞周期の同調を行った。EDTA-トリプシン溶液処理により細胞を回収、PBS (-) にて洗浄し、さらに 70% (v/v) エタノールにて固定した。その後、propidium iodide と RNase A に室温で 30 分間反応し、フローサイトメトリー (EPICS, XL-MCL, System II, Coulter, Miami, FL, USA) を用いて 1 × 10⁴ 個の細胞について、PI の特異蛍光による細胞の DNA 量を測定し、細胞周期の各相に存在する細胞の割合を算定した。

10. RNA の抽出、Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) 法および Real-time RT-PCR 法

培養細胞より全 RNA を抽出し、1 μg の全 RNA を雑型としてランダムプライマー (Invitrogen, CA, USA) を用い、逆転写酵素 (Invitrogen) を加え、42 °C 50 分間、70 °C 15 分間反応させ逆転写を行い、cDNA を作製した。RT-PCR 法では、プライマーおよび 1.1 × ReddyMixTM PCR Master Mix (1.5 mM MgCl₂) (ABgene, Epsom, Surrey, U.K) を用い、PCR Thermal cycler (宝酒造) にて PCR を行った。PCR は、94 °C で 5 分 DNA を変性させた後、94 °C で 60 秒、全ての熱ショック蛋白質 (heat shock proteins; 以下 HSPs と略記する) ファミリーのアニーリング温度は 58 °C で、内部標準遺伝子 glycerldehyde-3-phosphate dehydrogenase (以下 G3PDH と略記する) のアニーリング温度は 52 °C で 60 秒、72 °C で 90 秒を HSP ファミリーは 30 サイクル、G3PDH は 23 サイクル、最後に 72 °C 10 分で DNA 断片の増幅を行った。PCR 産物は 100 ng/ml ethidium bromide 含有の 1.5% アガロースゲルにて電気泳動を行い、UV 撮影装置 FAS-III (東洋紡績、大阪) にて観察を行った。Real-time RT-PCR は、各種の遺伝子に特異的なプライマー (最終濃度 1 μM)、SYBR Green I (Roche)、MgCl₂ (最終濃度 3 mM) を混和し、LightCycler 3.5 (Roche) を用いて下記の条件下に PCR 反応を行った。内部標準遺伝子 β-actin は 95 °C 10 分間の熱変性後、95 °C にて 10 秒、60 °C にて 10 秒、72 °C にて 10 秒のアニーリングを 1 サイクルとし、計 35 サイクルを行った。Hsp70A は 95 °C 10 分間の熱変性後、95 °C にて 10 秒、58 °C にて 20 秒、72 °C にて 20 秒のアニーリングを 1 サイクルとし、計 35 サイクルを行った。β-actin に対する相対的な Hsp70A の発現量を算出した。用いたプライマーの塩基配列を表 1 に示す。なお、Real-time RT-PCR で用いた Hsp70A のプライマーの塩基配列は、RT-PCR で用いたプライマーと同じものを用いた。

11. ELISA 法による内在性 HSP70 蛋白質発現量の検討

癌細胞に内在する HSP70 蛋白質の発現量は、human HSP70 ELISA kit (Stressgen, Victoria, Canada) を用いて測定した。1 × 10⁵ 個の細胞を 6 穴ディッシュに播種、4 日間培養を行い、培養細胞を PBS (-) で 2 回洗浄、lysate buffer にて可溶化、以後の操作は kit の添付プロトコールに従った。

12. ベクターおよびトランスフェクション法

Hsp70A 発現ベクターは、Children's Hospital Medical Center (Cincinnati, Ohio, USA) の Dr. Hector R. Wong より供与されたヒト pcDNA3-Hsp70A を用いた。また、empty vector として pcDNA3.1(+) (Invitrogen) を用いた。両ベクターを Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いてトランスフェクションした。培地に 200 μg/ml G418 (Sigma)

表1 プライマーの塩基配列およびPCR産物のサイズとアニーリング温度

Gene	Primers	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)
<i>Hsp27</i>	5'-ATGGCGTGGTGGAGATCAC-3' 5'-CAAAGAACACACAGCTGC-3'	347	58
<i>Hsp60</i>	5'-ATTCCAGCAATGACCATTCG-3' 5'-GAGTTAGAACATGCCACCTC-3'	306	58
<i>Hsp70A</i>	5'-TGTCCGTTCCAGCCCCCAA-3' 5'-GGGCTTGCTCCGTCGTTGAT-3'	359	58
<i>Hsp70B</i>	5'-CTCCAGCATCCGACAAGAACG-3' 5'-ACGGTGTGTCGGGGTTCAGG-3'	244	58
<i>Hsp70C</i>	5'-TTGAGGAGGTGGATTAGGGGC-3' 5'-AGCCTTGTAGTGTTCGCC-3'	336	58
<i>Hsc70</i>	5'-TGTGGCTTCCTCGTTATTGG-3' 5'-GCCAGCATCATCACCAACCAT-3'	342	58
<i>Hsp90 α</i>	5'-AAAAGTGAAAGGTGGTTG-3' 5'-TATCACAGCATCACTTAGTA-3'	624	58
<i>Hsp90 β</i>	5'-AGAAGGTGAGAAAGGAAGCC-3' 5'-AAGAGTAGAGAGGGAAATGGG-3'	626	58
<i>G3PDH</i>	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' 5'-TCCACCACCTGTCGTGTA-3'	451	52
<i>MMP-1</i>	5'-GATTCTACATGC GCACAAATC-3' 5'-CTAACAGCCCAGTACTTAT-3'	160	57
<i>MMP-7</i>	5'-TGATTGGCTTGC CGCA-3' 5'-GTTCATGAG TTGCAGCATACA-3'	185	57
<i>MMP-9</i>	5'-AACTTGCACCGAC AAGA-3' 5'-CTCAGTGAGCGGTACATAG-3'	152	57
<i>MMP-10</i>	5'-AGCTTGATGATACCACT-3' 5'-GATCCCGAAGGA ACAGATT-3'	155	57
<i>MMP-13</i>	5'-AGGTCTGGAGATATGATGATACT-3' 5'-ACTGTATGGGTCCGTTG-3'	149	57
<i>β-actin</i>	5'-ATAGCACAGCCTGGATAGCAACGTAC-3' 5'-CACCTCTACAA TGAGCTGCGTGTG-3'	160	60

を添加しセレクションを行い、クローニングシリンドーにより G418耐性クローンを選択した。選択した細胞は、200 μg/ml G418を添加した培地で維持した。また、得られた *Hsp70A* 遺伝子導入細胞における遺伝子の発現は、Real-time RT-PCR 法およびウエスタンプロット法にて確認した。

13. *Hsp70A* 過剰発現細胞に対する BrdU 取り込み能の検討

5×10³個の細胞を96穴ディッシュに播種、4日間培養し最終濃度10 μM 濃度にて培養液中に BrdU を添加し、37 °C で 4 時間培養した。以後、BrdU labeling and detection kit III (Roche) の添付プロトコールに従い固定、抗体反応、洗浄の過程を経て、プレートリーダーを用いて解析した。

14. Small interfering RNA (siRNA) 法

1×10⁴個の培養細胞を96穴プレートに播種し、翌日合成 siRNA または Negative control を Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いてトランسفェクションした。ヒト *Hsp70A* および *Hsp70C* に対する siRNA は、5'-AA GAACCAGGUGGCGCUGAAC-3' を用いた (Dharmacon, Lafayette, CO, USA)。Negative control には、Dharmacon 社の siCONTROL Non-Targeting siRNA を用いた。トランسفェクション後、48時間にて前述の BrdU 取り込み能

の検討を行った。また、得られた *Hsp70A* および *Hsp70C* 遺伝子の発現量は、RT-PCR 法およびウエスタンプロット法により確認した。

15. HSP70蛋白質に対するウエスタンプロット法

培養細胞を PBS (-) で 2 回洗浄し、lysate buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 % Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β-glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1 μg/mL leupeptin) 200 μl にて可溶化した。蛋白質は Bradford 法で定量した後、蛋白質量 15 μg の試料にサンプルバッファーを添加し、70 °C 10 分間加熱後、このサンプルを 12.5 % ポリアクリルアミドゲル内で電気泳動し、サンプル内の蛋白質を分離した。その後、ゲルを polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Invitrogen) に転写し、5 % スキムミルクにてブロックを行った。PBS-T にて 5 分間洗浄後、4,000 倍に希釈したマウス抗ヒト *Hsp70* 抗体 (Stressgen)，5,000 倍希釈したマウス抗ヒト β-actin 抗体 (Sigma) を用いて室温で 1 時間反応させた。反応後、PBS-T にて 5 分間 3 回洗浄し、4,000 倍希釈の horseradish peroxidase (以下、HRP と略記する) 標識抗マウス IgG (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) を用いて室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、化学的蛍光検出剤 (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) と反応させ、X 線フィルム (Hyper ECL Film, Amersham Pharmacia Biotech) にて感光させ反応蛋白を検出した。

16. マウス腫瘍に対する特性遠赤外線の抗腫瘍効果の検索

A431癌細胞の移植実験には、造腫瘍性を考慮して、6～8 週齢雄の Crlj: CD1-Foxn1ヌードマウス (日本チャールス・リバー、横浜) を、Sa3癌細胞の移植実験には、4～5 週齢雄の CB17/Icr-Prkdc/CrlCr1 SCID マウス (日本チャールス・リバー、横浜) を用いた。マウスの飼育は特性遠赤外線の透過性を考慮し、プラスチック製ケージ内で行い、放射線滅菌固体飼料 (オリエンタル酵母工業、東京) および滅菌水を常時与えた。50 μg の高濃度マトリゲル (Becton Dickinson Labware, MA, USA) 含有の 100 μl PBS (-) に懸濁した 1×10⁶ 個の癌細胞をマウス背部皮下に移植した。移植直後よりマウスを特性遠赤外線照射群 (以下 Limited FIR 群と略記する) と非照射群 (以下コントロール群と略記する) に分けた。照射は、24時間連続照射で 30 日間行った。実験期間中は、5 日間隔で腫瘍の長径と短径を測定し、下記の式にて換算腫瘍体積を算出した。

$$\text{腫瘍体積} = \frac{(\text{長径}) \times (\text{短径})^2}{2}$$

なお、本研究にて行われた動物実験は徳島大学歯学部動物実験委員会により承認された動物実験計画書に基づいて行った。

17. A31腫瘍に対するマイクロアレー解析

特性遠赤外線のA431移植腫瘍に与える影響を検討するため、マイクロアレー解析を行った。A431腫瘍移植後30日目にコントロール群とLimited FIR群1サンプルずつ、特にマウス由来の結合組織や筋層を含まないよう細心の注意を払って腫瘍組織のみを可及的に摘出した。摘出した腫瘍組織からQiagen RNeasy Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany) の添付プロトコールに従って全RNAの抽出を行った。抽出したRNAの純度は、UV分光光度計にて A_{260}/A_{280} の比が1.8以上であることを確認後、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA) を用いてRNAの分解が認められないことを確認した。続いて、Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit (Agilent Technologies) を用いて、500 ng全RNAサンプルからcDNAの合成、cRNAのラベルと増幅を行った。cRNAはLimited FIR群をCy5、コントロール群をCy3にてラベル化した。約19,000個の代表的ヒト遺伝子を搭載したHuman 1A v2 oligo microarray (Agilent Technologies) を用いて、ラベル化cRNAを60℃、17時間ハイブリダイゼーションを行った。アレイの洗浄、乾燥後スキャンは、Agilent Technologies Microarray Scanner (Agilent Technologies) を用いた。さらに、解析は、Feature Extraction (Agilent Technologies) およびGeneSpring7.0 (Silicon Genetics, CA, USA) ソフトウェアを用いて行い、スポットの不均一性、サーチュレーションおよびバックグラウンドと有意差がないシグナルスポットを排除した後、P値が0.01以下の遺伝子のみをピックアップした。

18. Matrix metalloproteinases (以下、MMPsと略記する)

に対するReal-time RT-PCR法

マイクロアレー解析より得られた結果を評価するため、5個のMMPs (*MMP-1, -7, -9, -10, -13*)についてReal-time RT-PCRを行った。A431移植腫瘍から全RNAを抽出し、1 µgの全RNAを鋳型としてランダムプライマー (Invitrogen, CA, USA) を用い、逆転写酵素 (Invitrogen) を加え、42℃50分間、70℃15分間反応させ逆転写を行い、cDNAを作製した。MMPsに対するヒト特異的プライマーは、LightCycler Probe Design 2.0 (Roche) を用いて設計を行った。用いたプライマーの塩基配列を表1に示す。各種の遺伝子に特異的なプライマー(最終濃度1 µM), SYBR Green I (Roche), MgCl₂(最終濃度3 mM)を混和し、LightCycler 3.5 (Roche) を用いてPCR反応を行った。内部標準遺伝子 β -actinは、95℃10分間の熱変性後、95℃にて10秒、60℃にて10秒、72℃にて10秒のアニーリングを1サイクルとし、計35サイクル行った。全てのMMPsは、95℃10分間の熱変性後、95℃にて10秒、57℃にて10秒、72℃にて10秒のアニーリングを1サイクルとし、計35サイクル行った。 β -actinに対する相対的なMMPsの発現量を算出した。

19. 組織学的検討

腫瘍移植後30日目にコントロール群およびLimited FIR群マウスを屠殺し、腫瘍組織のみを摘出し4%パラホルムアルデヒド/PBSで4℃にて4時間固定した。その後、エタノールにて脱水し、パラフィン包埋後、4 µmの組織切片を作製し、ヘマトキシリソ・エオジン染色(以下、HE染色と略記する)を施した。

20. TUNEL法による腫瘍組織内アポトーシスの検出

腫瘍移植後30日目にコントロール群およびLimited FIR群マウスを屠殺し、腫瘍組織のみを摘出し4%パラホルムアルデヒド/PBSで4℃にて4時間固定した。その後、エタノールにて脱水し、パラフィン包埋後、4 µmの組織切片を作製した。腫瘍組織内アポトーシスの検出は、TUNEL法にてIn situ Apoptosis Detection kit (Takara, Otsu, Japan) を用いて行った。すなわち、脱パラフィン後Proteinase K (20 µg/ml)にて室温15分反応後、PBS(-)にて洗浄しTdT酵素およびFITC標識dUTPにて37℃90分間ラベリング反応を行った。PBS(-)にて洗浄した後、アポトーシスの観察は、蛍光顕微鏡(OLYMPUS, BX51, Tokyo, Japan)にて行った。また、アポトーシスのポジティブコントロールは、キットに添付のラット乳腺組織のパラフィン包埋切片を使用した。

21. 免疫組織学的検討

腫瘍移植後30日目にコントロール群およびLimited FIR群マウスを屠殺し、腫瘍組織のみを摘出し4%パラホルムアルデヒド/PBSで4℃にて4時間固定した。その後、エタノールにて脱水し、パラフィン包埋後、4 µmの組織切片を作製した。脱パラフィン後、室温20分間5%ヤギまたはウサギ正常血清にてブロッキングを行った。1%牛血清アルブミン(以下BSAと略記する)を含むPBSで1:50に希釈したウサギ抗ヒトMMP-1抗体(Lab Vision, CA, USA)、ヤギ抗ヒトMMP-9抗体(Santa Cruz, CA, USA)、ウサギ抗ヒトMMP-10抗体(Lab Vision)、ウサギ抗ヒトMMP-13抗体(Lab Vision)およびヒト特異抗体としてマウス抗ヒトcytokeratin 10抗体(EXIBO, Vestecu Prahy, Czech Republic)を一次抗体として、室温で1時間反応させた。PBSで洗浄後、1%BSAを含むPBSで1:400に希釈したFITC標識抗マウス抗体(Santa Cruz)、およびrhodamine標識抗ラビット抗体(Sigma)、rhodamine標識抗ヤギ抗体(Santa Cruz)を用いた。観察は、蛍光顕微鏡(Olympus BX51, Tokyo, Japan)を用いて行った。

22. 統計学的解析法

得られたデータは平均値±SDで表現し、Student's t-testまたはMann-Whitney U-testにより有意差検定を行い、p<0.05を有意差ありとした。

結 果

1. 特性遠赤外線放射セラミックスの特徴

本研究で用いた特性遠赤外線放射セラミックスの各波長域における分光放射輝度をFTIRを用いて測定を行った。その結果、試料温度40℃では理想黒体の分光放射輝度に対する遠赤外線照射セラミックスの分光放射輝度すなわち放射効率は97%以上で、分光放射輝度10W/m²・str・μm以上を示す波長域は、7.2~12μmであった(図2)。

2. 特性遠赤外線の癌細胞増殖への影響

特性遠赤外線の3種の癌細胞増殖に与える影響について検討した。生細胞数測定によって増殖能を検討した結果、HSC3細胞は6日目以降から、Sa3細胞では4日目以降から特性遠赤外線により増殖の抑制が認められ、HSC3細胞では6日、8日目にSa3細胞では6日目に有意に増殖が抑制された(図3A, 3B)。一方、A431細胞は、特性遠赤外線照射で細胞増殖に変化は認められなかった(図3C)。また、特性遠赤外線照射はHSC3

表2 フローサイトメトリーによる細胞周期の解析結果

Cell cycle phase	A431		HSC3		Sa3	
	Control	Limited FIR	Control	Limited FIR	Control	Limited FIR
G2/M	13.3%	15.1%	33.3%	40.1%	16.8%	21.1%
Sub-G1	0.1%	0.1%	0.4%	0.3%	0.2%	0.2%
G1	78.9%	76.7%	54.7%	43.2%	74.9%	66.0%
S	5.5%	5.7%	4.1%	4.3%	5.0%	5.7%

図6-(A)に基づいて、培養96時間における各癌細胞の各細胞周期での集積の割合を算出した。

およびSa3細胞のBrdU取り込みを有意に抑制したが、A431細胞ではその取り込みに明らかな差を認めなかつた(図3D)。

3. 特性遠赤外線によるアポトーシスまたは細胞壊死の誘導

特性遠赤外線による癌細胞のアポトーシス誘導の有無を検討するためにTUNEL法を用いて行った。7日間の特性遠赤外線照射により、いずれの細胞においてもアポ

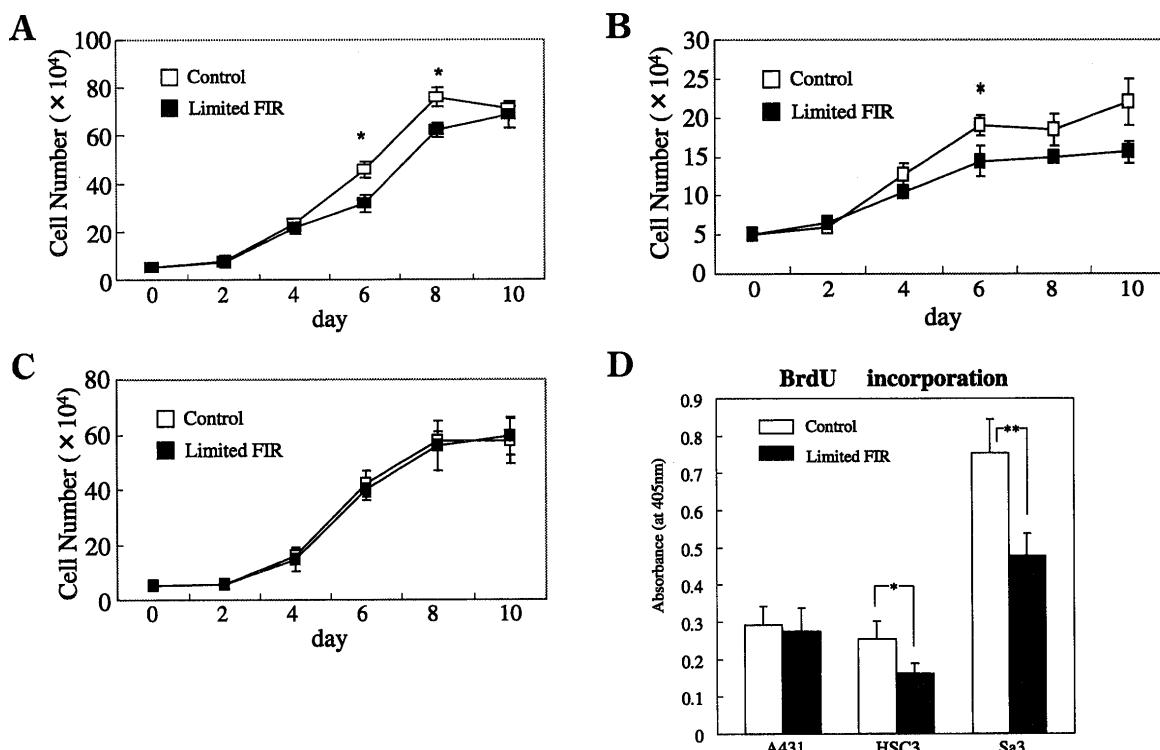


図3 A431, HSC3, Sa3細胞の特性遠赤外線照射による増殖能の検討

HSC3, Sa3およびA431細胞を24穴ディッシュに5×10⁴個ずつ播種し、実験方法の記載に従って経時的に細胞数を測定した。各値は平均値±標準偏差(n=3)を示す。(A)はHSC3細胞、(B)はSa3細胞、(C)はA431細胞である。(* p<0.05) HSC3細胞は6日目以降から、Sa3細胞では4日目以降から特性遠赤外線により増殖の抑制が認められ、HSC3細胞では6日、8日目にSa3細胞では6日目に有意に増殖が抑制された。一方、A431細胞は、特性遠赤外線照射で細胞増殖に変化は認められなかった。(D)BrdU取り込み能の検討。各細胞を実験方法に従って培養後、ELISA法にてBrdUの取り込みを測定した。各値は平均値±標準偏差(n=5)を示す。(* p<0.05, ** p<0.01) 特性遠赤外線照射はHSC3およびSa3細胞のBrdU取り込みを有意に抑制したが、A431細胞ではその取り込みに明らかな差を認めなかつた。

トーシスの明らかな誘導は認められなかった(図4)。また、48時間特性遠赤外線を照射することにより、Sa3細胞で壊死細胞はLimited FIR群で $7.78 \pm 1.48\%$ 、コントロール群で $4.76 \pm 1.17\%$ 、生細胞は、Limited FIR群で $88.70 \pm 0.98\%$ 、コントロール群で $90.47 \pm 0.95\%$ とわずかな壊死細胞の増加と生細胞の減少を認めた(図5A, 5B)。一方で、A431およびHSC3細胞で壊死細胞、生細胞の割合に明らかな差を認めなかった(図5A, 5B)。

4. 特性遠赤外線照射による細胞周期への影響

特性遠赤外線照射下で培養した3種類のヒト癌細胞(A431, HSC3, Sa3細胞)についてフローサイトメトリーによる細胞周期の解析を行った。特性遠赤外線照射後24時間から96時間まで経時的にHSC3細胞でG2/M期に細胞が集積し、特性遠赤外線照射によるG2/M arrestの惹起が示唆された(図6A)。Sa3細胞では、特性遠赤外線照射後72時間から96時間までG2/M期にわずかに細胞が集積した(図6A)。一方、A431細胞では、特性遠赤外線照射による細胞周期の明らかな変化は認められなかった(図6A)。培養96時間においてHSC3, Sa3細胞では、コントロール群でG1期にそれぞれ54.7%, 74.9%の細胞が、G2/M期にそれぞれ33.3%, 16.8%の細胞が集積した(表2)。一方で、Limited FIR群ではG1期にそれぞれ43.2%, 66.0%の細胞が、G2/M期にそれぞれ40.1%, 21.1%の細胞が集積した(表2)。しかしながら、A431細胞では培養96時間において、Limited FIR群およびコントロール群でG1期およびS期の細胞集積にほとんど変化を認めなかった(表2)。また、培養96時間における各細胞のG2/G1比は、HSC3細胞において特性遠赤外線照射により顕著に高く、Sa3細胞ではわずかに高い傾向を認めた(図6B)。A431細胞では、G2/G1比に明らかな差を認めなかった(図6B)。以上のことから、特にHSC3細胞で特性遠赤外線照射によるG2/M arrestの惹起が示唆された。

5. 癌細胞におけるHspファミリー, Hsp70A mRNAおよび内在性HSP70蛋白質の発現の検討

特性遠赤外線照射によるHspファミリーの遺伝子発現をRT-PCRを用いて解析した。A431細胞でHsp70ファミリーの発現が、他の2種の細胞に比べ高い傾向を示した(図7)。また、Hsp70ファミリーの発現は、コントロール群とLimited FIR群で明らかな差異を認めなかつた(図7)。Hsp70ファミリー以外のHsp遺伝子の発現については各細胞間で明らかな差異を認めなかつた(図7)。

次に、Hsp70A mRNAの発現量を定量的に測定するため、各癌細胞を経時的に特性遠赤外線照射した後、全RNAを回収し、Real-time RT-PCRを行つた。その結果、A431細胞のHsp70A mRNA発現量は、3種の癌細胞の中

で12, 24, 48時間、4, 8, 12日を通して最も高かつた(図8A)。また、Hsp70A mRNAの発現量は、いずれの細胞においてもコントロール群とLimited FIR群で明らかな差異を認めなかつた。さらに、A431細胞の内在性HSP70蛋白質の発現量は、HSC3およびSa3細胞に比べ有意に高かつた(図8B)。

6. 癌細胞におけるHsp70A過剰発現の影響

癌細胞のHsp70A発現の定量結果より、A431細胞で高い発現を認めたこと、およびHsp70A発現量の高いA431細胞の増殖は特性遠赤外線照射により変化が認められず、Hsp70A発現量の低いHSC3, Sa3細胞で増殖が抑制されたことから、A431細胞およびHSC3細胞にHsp70Aを過剰発現させることによる細胞増殖能の変化を検討した。そこで、A431およびHSC3細胞にHsp70A発現ベクターをトランスフェクションすることによって、Hsp70A過剰発現細胞(以下A431-Hsp70A細胞、HSC3-Hsp70A細胞と略記する)を樹立した。樹立した各細胞のHsp70A mRNAおよびHSP70蛋白質の発現量をそれぞれReal-time RT-PCR, ウエスタンブロッティングにて確認した結果、各過剰発現細胞で有意なHsp70A mRNA発現の上昇およびHSP70蛋白質の発現の上昇を認めた(図9A, 9B)。次に、生細胞数測定によって各過剰発現細胞の増殖能を検討した結果、A431-Hsp70A細胞では、培養後2日目から4日目にかけて特性遠赤外線照射の有無に関わらず、コントロール細胞(以下、A431-wt細胞と略記する)およびempty vector導入細胞(以下、A431-Neo細胞と略記する)に比べ有意な細胞増殖を示した(図10A)。同様に、HSC3細胞にHsp70A発現ベクターをトランスフェクションした結果、HSC3-Hsp70A細胞は、特性遠赤外線照射の有無に関わらず6日目にコントロール細胞(以下、HSC3-wt細胞と略記する)およびempty vector導入細胞(以下、HSC3-Neo細胞と略記する)に比して有意な細胞増殖を示し、また、コントロール群およびLimited FIR群で明らかな差を認めなかつた(図10B)。さらに、特性遠赤外線照射下にHsp70A発現ベクターをトランスフェクションした細胞のBrdUの取り込み能について検討した。A431-Hsp70A細胞は、特性遠赤外線照射の有無に関わらず、A431-wt細胞およびA43-Neo細胞に比べ有意なBrdU取り込みを示し、また、特性遠赤外線照射によるBrdU取り込みに明らかな差を認めなかつた(図11A)。HSC3-wtおよびHSC3-Neo細胞は、特性遠赤外線照射によりBrdU取り込みは有意に抑制された。一方で、HSC3-Hsp70A細胞のBrdU取り込みは、特性遠赤外線照射の有無に関わらず、HSC3-wt細胞、HSC3-Neo細胞に比べて有意に増加し、Limited FIR群のHSC3-Hsp70A細胞のBrdU取り込みは、コントロール群のHSC3-Hsp70A細胞とほぼ同様な取り込みを示した(図11B)。

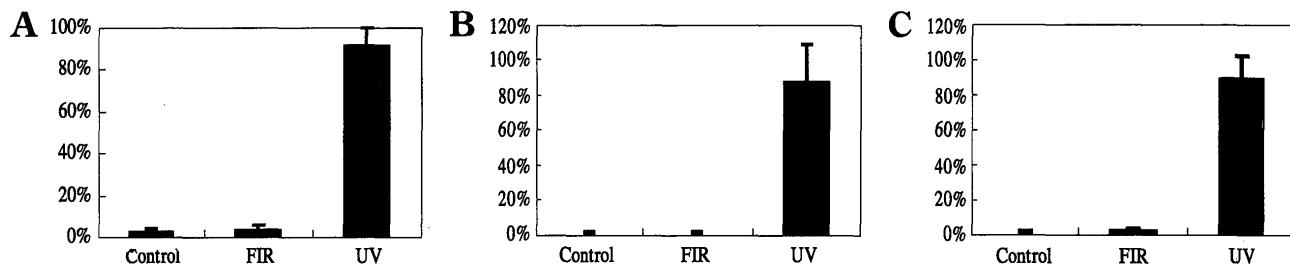


図4 TUNEL法によるアポトーシスの検出

35 mm ディッシュ内の中形シート上で培養した A431 (A), HSC3 (B), Sa3 (C) 細胞を 7 日間特性遠赤外線照射し、実験方法の記載に従って TUNEL 染色を行った。アポトーシス細胞の観察は、蛍光顕微鏡にて行い、無作為に選んだ 10 視野よりアポトーシス陽性細胞率を求めた。7 日間の特性遠赤外線の照射により、いずれの細胞においてもアポトーシスの明らかな誘導は認められなかった。

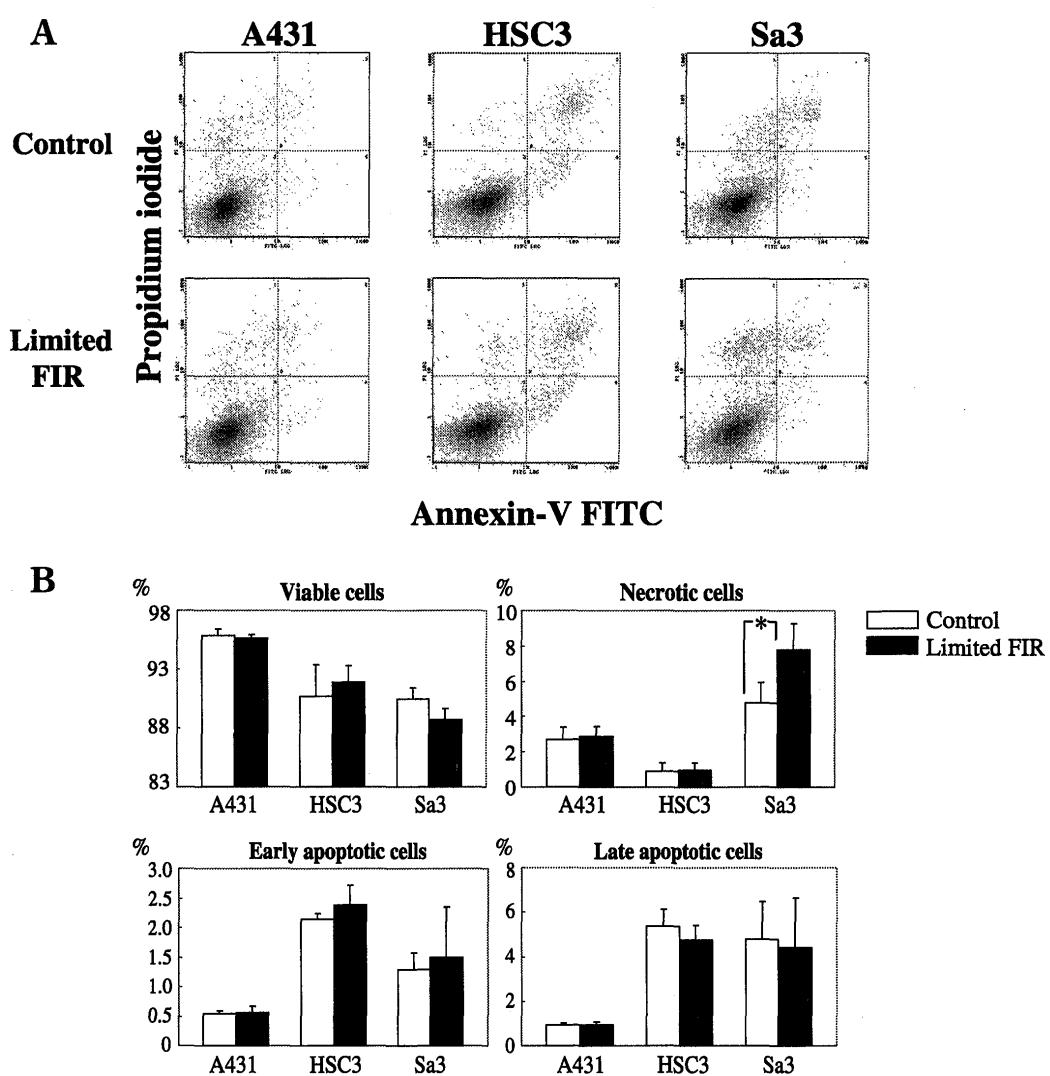


図5 Annexin V-propidium iodide二重染色法による壞死細胞の検出

(A) 48時間特性遠赤外線照射下で培養した各癌細胞についてフローサイトメトリーを用いて解析を行った。Sa3細胞で Annexin V 陰性 / PI 陽性の壞死細胞の集積を認めた。(B) (A)に基づいて算出を行ったその定量結果を示す。その際、Annexin V 陰性 / PI 陽性を壞死細胞、Annexin V 陽性 / PI 陽性を後期アポトーシス、Annexin V 陽性 / PI 陰性を初期アポトーシス細胞とした。各値は平均値±標準偏差 ($n=3$) を示す。(* $p<0.05$) Sa3細胞でわずかな壞死細胞の増加と生細胞の減少を認めた。一方で、A431およびHSC3細胞で壞死細胞、生細胞の割合に明らかな差を認めなかった。

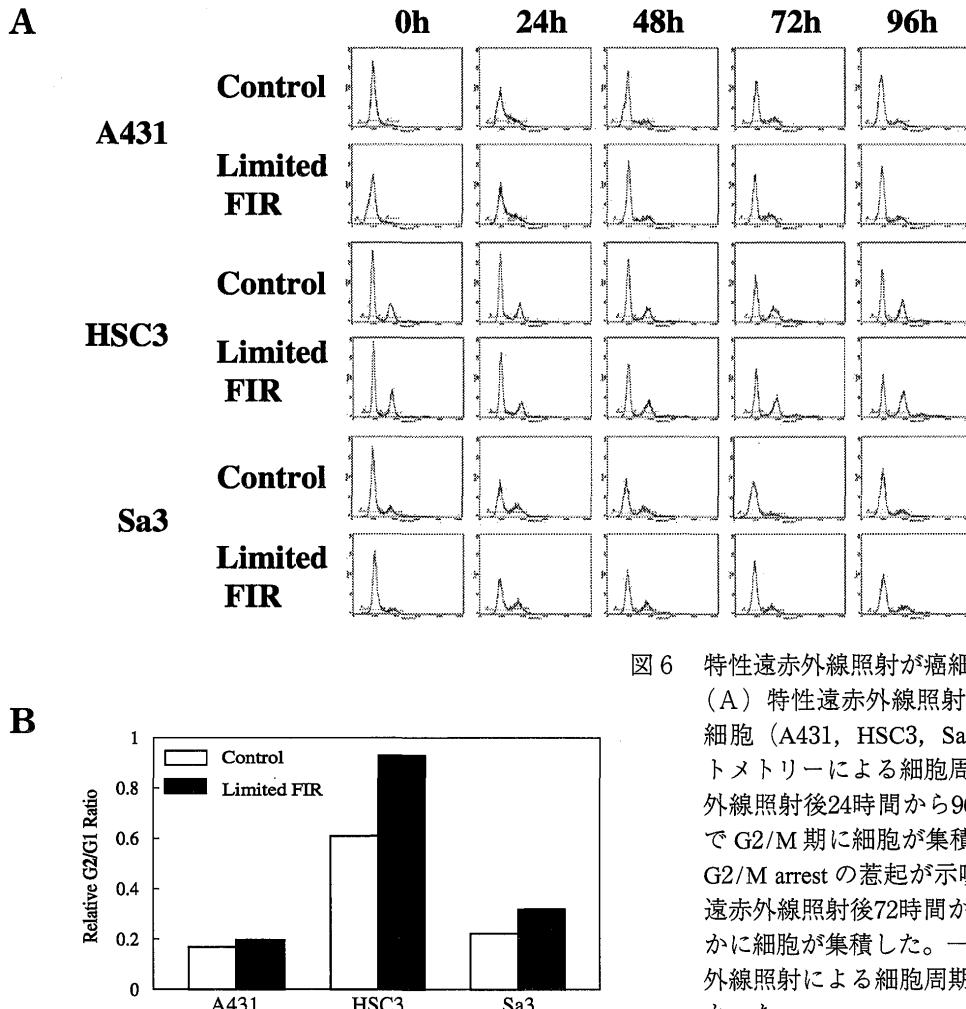


図 6 特性遠赤外線照射が癌細胞の細胞周期に及ぼす影響
(A) 特性遠赤外線照射下で培養した3種類のヒト癌細胞 (A431, HSC3, Sa3細胞) についてフローサイドメトリーによる細胞周期の解析を行った。特性遠赤外線照射後24時間から96時間まで経時的にHSC3細胞でG2/M期に細胞が集積し、特性遠赤外線照射によるG2/M arrestの惹起が示唆された。Sa3細胞では、特性遠赤外線照射後72時間から96時間までG2/M期にわずかに細胞が集積した。一方、A431細胞では、特性遠赤外線照射による細胞周期の明らかな変化は認められなかった。

(B) 各癌細胞の培養96時間におけるG2/G1比の算出を行った。各細胞のG2/G1比は、HSC3細胞において特性遠赤外線照射により顕著に高く、Sa3細胞ではわずかに高い傾向を認めた。A431細胞では、G2/G1比に明らかな差を認めなかった。なお、本実験は3回行い、同様の結果を得た。その実験結果の代表例を示す。

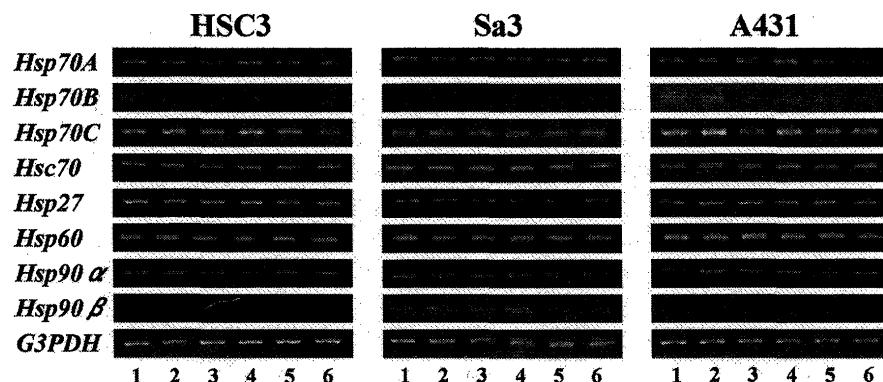


図 7 特性遠赤外線照射によるHspファミリーmRNAの発現の検討

特性遠赤外線照射後の各細胞より調整した全RNA 1 µgを用いてRT-PCRを行い、PCR産物を1.5%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムプロマイドにて染色した。G3PDHは、内部コントロールとして用いた。レーン1：コントロール群12 h, レーン2：コントロール群24 h, レーン3：コントロール群48 h, レーン4：Limited FIR群12 h, レーン5：Limited FIR群24 h, レーン6：Limited FIR群48 h。A431細胞でHsp70ファミリーの発現が他の2種の細胞に比べ高い傾向を示した。また、Hsp70ファミリーの発現は、コントロール群とLimited FIR群で明らかな差異を認めなかった。Hsp70ファミリー以外のHsp遺伝子の発現については各細胞間で明らかな差異を認めなかった。

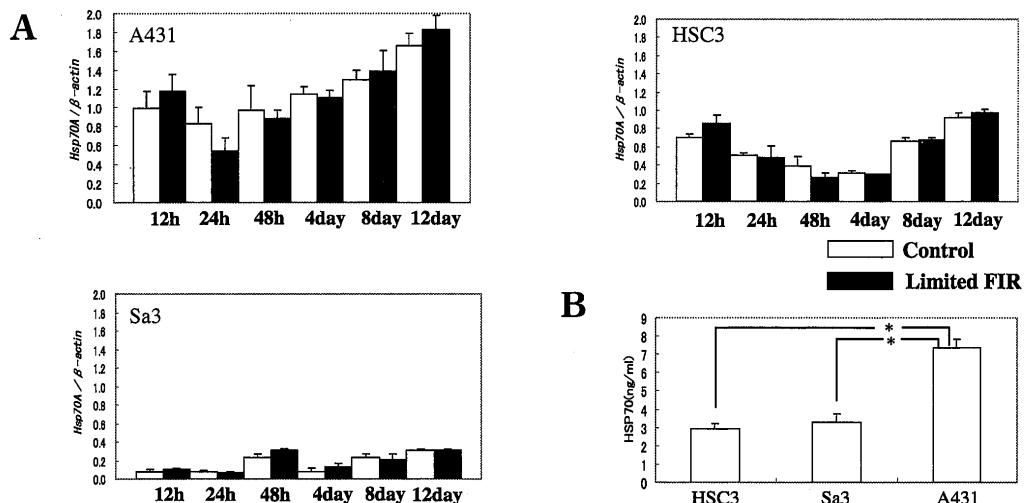
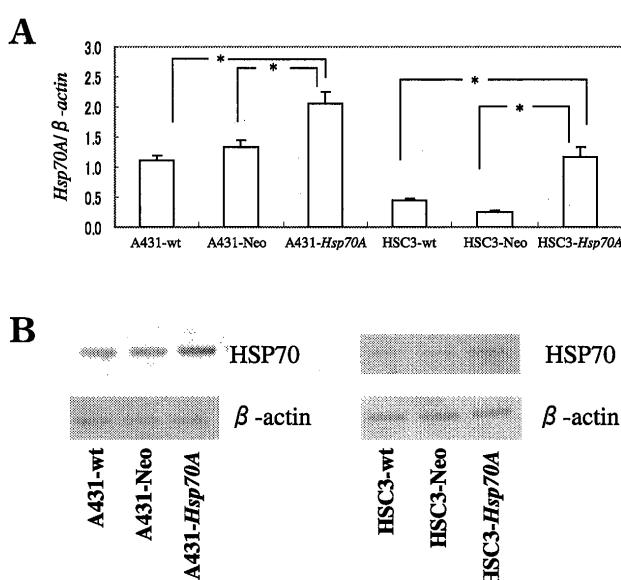


図8 癌細胞におけるHsp70A mRNAおよび内在性HSP70蛋白質の発現の検討

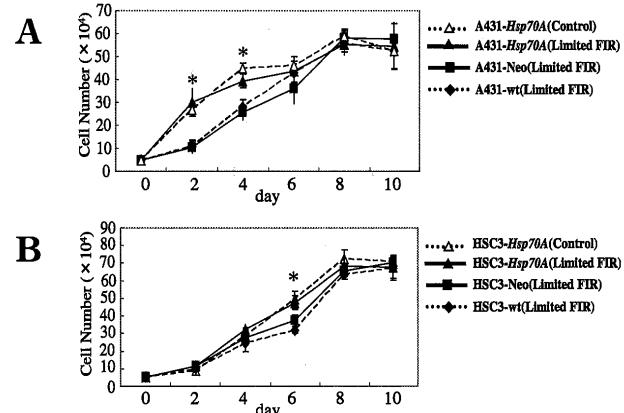
(A) *Hsp70A* mRNAの発現量を定量的に測定するため、各癌細胞を経時的に特性遠赤外線照射した後、全RNAを回収し、Real-time RT-PCRを行った。各発現量の表示は、*Hsp70A* mRNAの発現量と β -actin mRNAの発現量の比で算出した。*A431*細胞の*Hsp70A* mRNA発現量は、3種の癌細胞の中で12, 24, 48時間, 4, 8, 12日を通して最も高かった。また、特性遠赤外線照射による明らかな*Hsp70A*の発現への影響は認められなかった。

(B) ELISA法による内在性HSP70蛋白質の発現の検討。各癌細胞を通常培養下に4日間培養後、全蛋白質を回収し、HSP70蛋白質の発現量をELISA法によって測定した($n=4$)。*A431*細胞の内在性HSP70蛋白質の発現量は、*HSC3*および*Sa3*細胞に比べ有意に高かった。（* $p<0.05$ ）

図9 *Hsp70A*過剰発現細胞の遺伝子発現の検討

(A) *Hsp70A*過剰発現細胞 (*A431-Hsp70A*, *HSC3-Hsp70A*)における*Hsp70A* mRNA発現量をReal-time RT-PCRにて確認した。各過剰発現細胞で有意に*Hsp70A* mRNA発現の上昇を認めた。（* $p<0.05$ ）

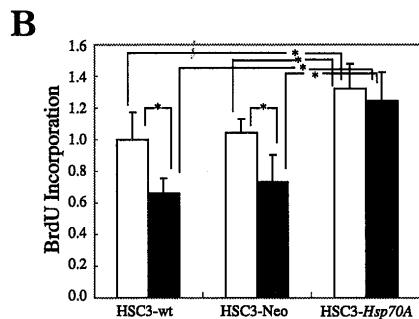
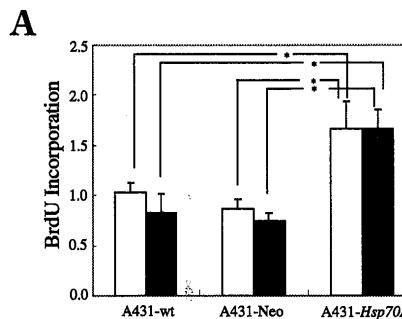
(B) *Hsp70A*過剰発現細胞 (*A431-Hsp70A*, *HSC3-Hsp70A*)におけるHSP70蛋白質発現量をウエスタンブロッティングにて確認した。各過剰発現細胞で有意にHSP70蛋白質の発現の上昇を認めた。

図10 *Hsp70A*過剰発現細胞の特性遠赤外線照射における増殖能の検討

(A) 24穴ディッシュに*Hsp70A*を過剰発現させた*A431*細胞を 5×10^4 個ずつ播種し、実験方法の記載に従って経時的に細胞数を測定した。各値は平均値±標準偏差($n=3$)を示す。（* $p<0.05$ ）

*A431-Hsp70A*細胞では、培養後2日目から4日にかけて特性遠赤外線照射の有無に関わらず、*A431-wt*細胞および*A431-Neo*細胞に比べ有意な細胞増殖を示した。

(B) は、同様に*Hsp70A*を過剰発現させた*HSC3*細胞の測定結果を示す。*HSC3-Hsp70A*細胞は、特性遠赤外線照射の有無に関わらず6日目に*HSC3-wt*細胞および*HSC3-Neo*細胞に比して有意な細胞増殖を示し、また、コントロール群およびLimited FIR群で明らかな差を認めなかった。

図11 *Hsp70A* 過剰発現細胞の BrdU 取り込み能の検討

(A) *Hsp70A* を過剰発現させた A431 細胞を 96 穴ディッシュに 5×10^3 個ずつ播種し、特性遠赤外線照射下に 4 日間培養を行い、BrdU 取り込み能を ELISA 法にて測定した。各値は、コントロールの BrdU 取り込み能を 1 とした場合の実験群の BrdU 取り込み能の値を表している ($n = 5$)。非照射群のコントロール細胞の BrdU 取り込みを 1 として表示した。A431-*Hsp70A* 細胞は、特性遠赤外線照射の有無に関わらず、A431-wt 細胞および A431-Neo 細胞に比べ有意な BrdU 取り込みを示し、また、特性遠赤外線照射による BrdU 取り込みに明らかな差を認めなかつた。

(B) は、同様に *Hsp70A* を過剰発現させた HSC3 細胞の BrdU 取り込み能を示す ($n = 5$)。HSC3-wt および HSC3-Neo 細胞は、特性遠赤外線照射により BrdU 取り込みは有意に抑制された。HSC3-*Hsp70A* 細胞の BrdU 取り込みは、特性遠赤外線照射の有無に関わらず、HSC3 細胞、HSC3-Neo 細胞に比べて有意に増加し、Limited FIR 群の HSC3-*Hsp70A* 細胞の BrdU 取り込みは、コントロール群の HSC3-*Hsp70A* 細胞とほぼ同様な取り込みを示した。なお、コントロールの 405 nm の吸光度は A431 細胞では 0.429 ± 0.046 、HSC3 細胞では 0.142 ± 0.024 であった。

7. 合成 siRNA を用いた *Hsp70A* および *Hsp70C* RNA 干渉による癌細胞への影響の検討

合成 siRNA および siCONTROL Non-Targeting siRNA を A431 細胞、HSC3 細胞の両細胞に導入し、導入後 2 日目に RT-PCR 法、ウエスタンプロット法により *Hsp70A* および *Hsp70C* mRNA および HSP70 蛋白質発現量について検討したところ、*Hsp70A* および *Hsp70C* RNA 干渉細胞では、*Hsp70A* および *Hsp70C* mRNA の発現の消失と HSP70 蛋白質発現の消失が認められた(図12A, 12B)。また、合成 siRNA 導入後 2 日目に BrdU 取り込みを検討したところ、*Hsp70A* および *Hsp70C* mRNA の発現をノックダウンさせた A431 細胞では、特性遠赤外線照射により、コントロール群に比し有意に BrdU 取り込みが抑制された(図12C)。同様に、*Hsp70A* および *Hsp70C* mRNA の発現をノックダウンさせた HSC3 細胞においても特性遠赤外線照射によりコントロール群に比し有意に BrdU 取り込みが抑制された(図12D)。

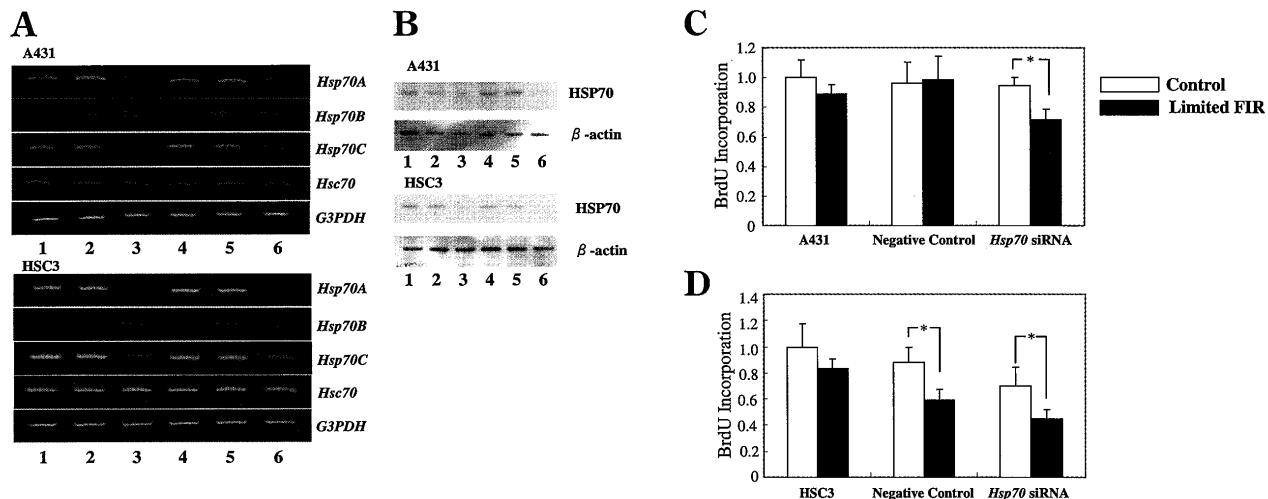
8. A431 および Sa3腫瘍の増殖に対する特性遠赤外線の影響の検討

In vivo での特性遠赤外線の抗腫瘍効果を検索するため、ヌードマウス、SCID マウス背部皮下に 1×10^6 個の A431 細胞、Sa3 細胞をそれぞれ移植して調整した A431、Sa3 腫瘍に対して移植直後から特性遠赤外線全身照射を連続して 30 日間行った。この結果、Limited FIR 群では、コントロール群に比べ、A431、Sa3 両腫瘍とともにそれぞれ 20 日目、15 日目以降から有意に腫瘍の増殖が抑制され

た(図13A, 13B, 14A, 14B)。また、組織学的検討において、A431 腫瘍はコントロール群で腫瘍細胞の筋層への浸潤が認められる(図13C-a, 13C-b)一方で、Limited FIR 群では、筋層への浸潤を認めなかつた(図13C-c, 13C-d)。Sa3 腫瘍はコントロール群で顕著な腫瘍の増生と間質への浸潤が認められる(図14C-a, 14C-b)一方で、Limited FIR 群では内部組織に核が濃縮し、細胞質が好酸性に染まる部分が認められた(図14C-c, 14C-d)。さらに、腫瘍組織内のアポトーシス細胞の有無を TUNEL 法にて検討を行った結果、A431 腫瘍では、コントロール群および Limited FIR 群ともにアポトーシスの誘導は認められなかつた(図15A, 15B)。一方、Sa3 腫瘍では、Limited FIR 群で DNA 断裂を示すアポトーシス陽性細胞が一部認められた(図15D)。コントロール群の Sa3 腫瘍では、明らかなアポトーシスの誘導は認められなかつた(図15C)。

9. A431腫瘍に対する遺伝子解析および免疫組織学的検討

A431 腫瘍に対する特性遠赤外線照射の影響を分子レベルで解析するために、マイクロアレー解析を行つた。Gene Ontology データベースを用いてクラスタリングを行つた結果、GO:catabolism において特性遠赤外線照射により *MMP-1, -7, -9, -10, -13* の 2 倍以上の発現のダウンが認められた(表3)。その他、GO:cell cycle で、*KLK10* が特性遠赤外線照射により 2 倍以上発現がアップ、*HIRA* と *SEPT6* の 2 倍以上の発現ダウンが認められ

図12 合成 siRNA を用いた *Hsp70A* および *Hsp70C* RNA 干渉による癌細胞への影響の検討

(A) RT-PCR 法による *Hsp70* ファミリー遺伝子の発現の検討。レーン 1: コントロール群のコントロール細胞、レーン 2: コントロール群の Negative control siRNA 導入細胞、レーン 3: コントロール群の合成 siRNA 導入細胞、レーン 4: Limited FIR 群のコントロール細胞、レーン 5: Limited FIR 群の Negative control siRNA 導入細胞、レーン 6: Limited FIR 群の合成 siRNA 導入細胞。*Hsp70A* および *Hsp70C* mRNA 干渉細胞ではコントロール群、Limited FIR 群ともに *Hsp70A* および *Hsp70C* mRNA の発現の消失が認められた。

(B) ウエスタンブロット法による HSP70蛋白質発現の検討。レーン 1: コントロール群のコントロール細胞、レーン 2: コントロール群の Negative control siRNA 導入細胞、レーン 3: コントロール群の合成 siRNA 導入細胞、レーン 4: Limited FIR 群のコントロール細胞、レーン 5: Limited FIR 群の Negative control siRNA 導入細胞、レーン 6: Limited FIR 群の合成 siRNA 導入細胞。*Hsp70A* および *Hsp70C* RNA 干渉細胞ではコントロール群、Limited FIR 群ともに HSP70蛋白質の発現の消失が認められた。

(C, D) 合成 siRNA 導入後 2 日目における BrdU 取り込み能の検討。*Hsp70A* および *Hsp70C* mRNA の発現をノックダウンさせた A431細胞 (C) では、特性遠赤外線照射によりコントロール群に比し有意に BrdU 取り込みが抑制された。同様に、*Hsp70A* 発現をノックダウンさせた HSC3細胞 (D) においても特性遠赤外線照射によりコントロール群に比し有意に BrdU 取り込みが抑制された。

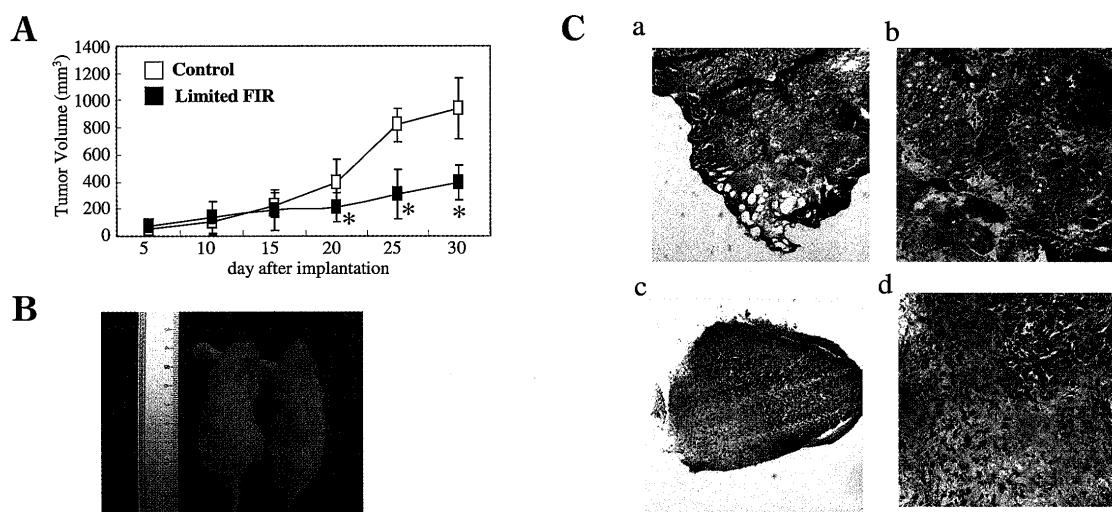


図13 A431移植腫瘍の増殖に及ぼす特性遠赤外線の影響の検討

(A) ヌードマウス背部皮下に 1×10^6 個の A431細胞を移植した直後より特性遠赤外線を 24 時間連続照射で 30 日間連日照射を行った。Limited FIR 群ではコントロール群に比べ 20 日目以降から有意に腫瘍の増殖が抑制された。(Mann-Whitney U-test, * p<0.05)

(B) 照射 30 日目の担癌ヌードマウスの写真を示す。左: 特性遠赤外線照射マウス、右: 非照射マウス

(C) 照射 30 日目における A431腫瘍の HE 染色像を示す。コントロール群で腫瘍細胞の筋層への浸潤が認められる (a, b) が、Limited FIR 群で、筋層への浸潤を認めなかった (c, d)。(a, c : $\times 40$ b, d : $\times 100$)

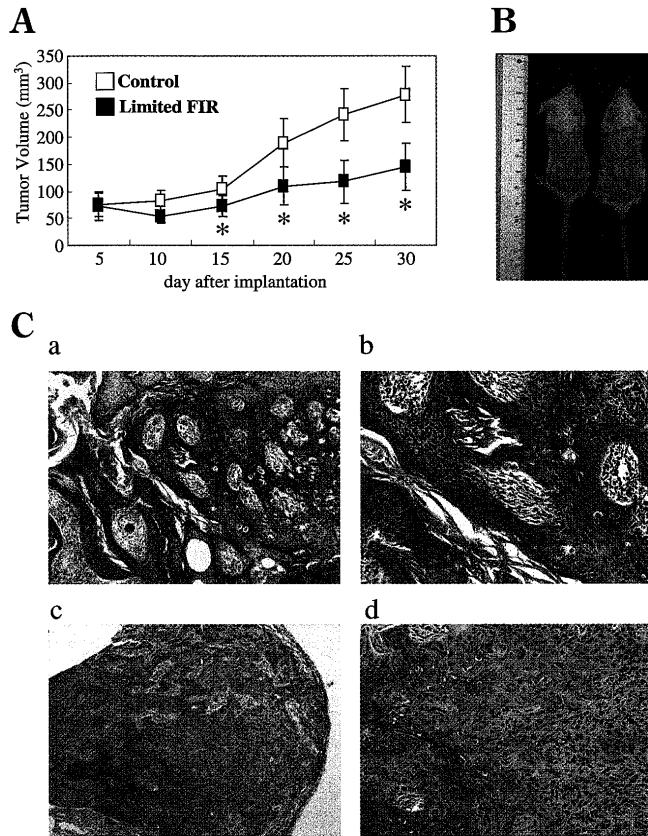


図14 Sa3移植腫瘍の増殖に及ぼす特性遠赤外線の影響の検討

(A) SCIDマウス背部皮下に 1×10^6 個のSa3細胞を移植した直後より特性遠赤外線を24時間連続照射で30日間連日照射を行った。Limited FIR群ではコントロール群に比べ15日目以降から有意に腫瘍の増殖が抑制された。(Mann-Whitney U-test, * p<0.05)

(B) 照射30日目の担癌SCIDマウスの写真を示す。左：特性遠赤外線照射マウス、右：非照射マウス

(C) 照射30日目におけるSa3腫瘍のHE染色像を示す。コントロール群で腫瘍細胞の顕著な増生と間質への浸潤(a, b)が、Limited FIR群で腫瘍組織の内部に核が濃縮し細胞質が好酸性に染まる部分が認められた(c, d)。(a, c : $\times 40$ b, d : $\times 100$)

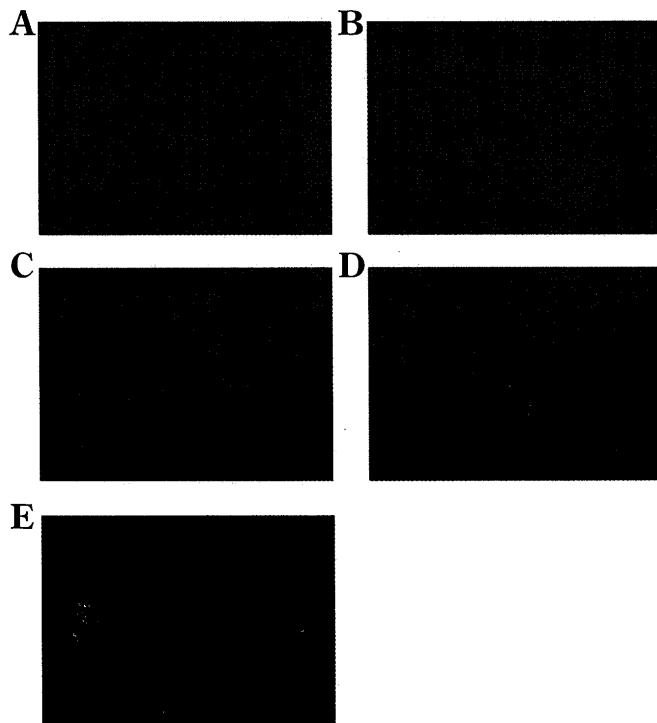


図15 TUNEL法による腫瘍組織内アポトーシスの検出

特性遠赤外線照射30日目におけるA431およびSa3腫瘍組織内のアポトーシスの検出をTUNEL法にて行った。A431腫瘍では、(A)コントロール群および(B) Limited FIR群とともにアポトーシスの誘導は認められなかった。Sa3腫瘍では、(D) Limited FIR群でDNA断裂を示すアポトーシス陽性細胞が一部認められた。(C) コントロール群のSa3腫瘍では、明らかなアポトーシスの誘導は認められなかった。(E) アポトーシスのポジティブコントロールとして、キットに添付のラット乳腺組織のパラフィン包埋切片を使用した。

表3 A431腫瘍の遺伝子発現に与える特性遠赤外線照射の影響の検討

Accession No.	Gene Name	Gene expression level	
		Fold Change(Cy5/Cy3)	P- value
GO:cell cycle			
NM_002776	<i>KLK10</i>	2.11	2.85E-09
NM_003325	<i>HIRA</i>	0.38	7.39E-13
NM_145802	<i>SEPT6</i>	0.35	2.02E-03
GO:catabolism			
NM_000045	<i>ARG1</i>	2.39	3.07E-11
NM_002425	<i>MMP10</i>	0.37	1.14E-13
NM_002423	<i>MMP7</i>	0.38	3.39E-05
NM_002427	<i>MMP13</i>	0.40	2.13E-11
NM_002421	<i>MMP1</i>	0.43	8.12E-11
NM_004994	<i>MMP9</i>	0.45	3.57E-10

A431細胞移植後30日目にコントロール群と Limited FIR 群それぞれ1サンプルずつ腫瘍組織のみを可及的に摘出、全 RNA 抽出後、実験方法の記載に従ってマイクロアレー解析を行った。GO : cell cycle と GO : catabolismにおいて 2 倍以上変動した遺伝子を示す。また、GO : cell proliferation と GO : apoptosis regulator activity で変動した遺伝子は存在しなかった。(GO ; gene ontology)

た(表3)。なお、GO:cell proliferation, GO:apoptosis regulator activity で変動した遺伝子は存在しなかった。さらに、マイクロアレー解析にて特性遠赤外線照射により 2 倍以上発現が抑制された MMP 群に着目し、Limited FIR 群 5 サンプル、コントロール群 5 サンプルで real-time RT-PCR にて検討した。その結果、MMP-1, -13 は有意にコントロール群に比べ Limited FIR 群で発現が抑制されたが、MMP-9, -10 は明らかな差を認めず、MMP-7 の発現は検出されなかった(図16)。さらに、A431細胞移植後30日における腫瘍組織の MMP-1, -9, -10, -13 発現を検索するために免疫組織学的検討を行った。その結果、Limited FIR 群に比べコントロール群で MMP-1, -9, -10, -13 は腫瘍実質に強く発現していた(図17)。mRNA レベルにおいて MMP-9 および MMP-10 の発現は、コントロールおよび Limited FIR 群で明らかな差を認めなかつたが、蛋白質レベルにおいて有意に抑制された。

考 察

近年、遠赤外線の生体に与える効果について多数報告されている¹⁻⁹⁾。遠赤外線と癌に関する報告では、高温域(35-41 °C)での遠赤外線全身温熱療法により自然乳癌高発系 SHN マウスの乳癌の増殖が抑制され^{11, 12)}、その効果がグルコース^{13, 14)}やコーヒーチェリーの投与¹²⁾と併用することにより促進されたとの報告がある。遠赤外線全身温熱療法を含めた温熱療法は、癌治療の1つとして幅広く行われている¹⁷⁻²⁰⁾。この温熱療法は、癌細

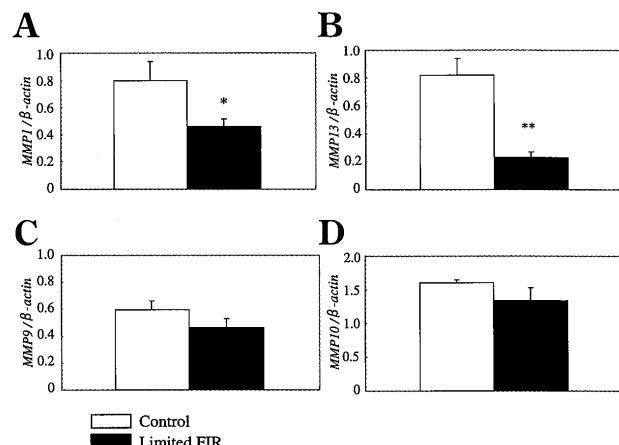


図16 Real-time RT-PCR 法による MMPs mRNA 発現の検討

MMP-1, -7, -9, -10, -13 mRNA の発現量を定量的に測定するためコントロール群、Limited FIR 群それぞれ 5 サンプルずつで Real-time RT-PCR 法にて検討を行った。MMP-1 (A), MMP-13 (B) は有意にコントロール群に比べ Limited FIR 群で発現が抑制されたが、MMP-9 (C), MMP-10 (D) は明らかな差を認めず、MMP-7 の発現は検出されなかった (Student's t-test, * p<0.05, ** p<0.01)

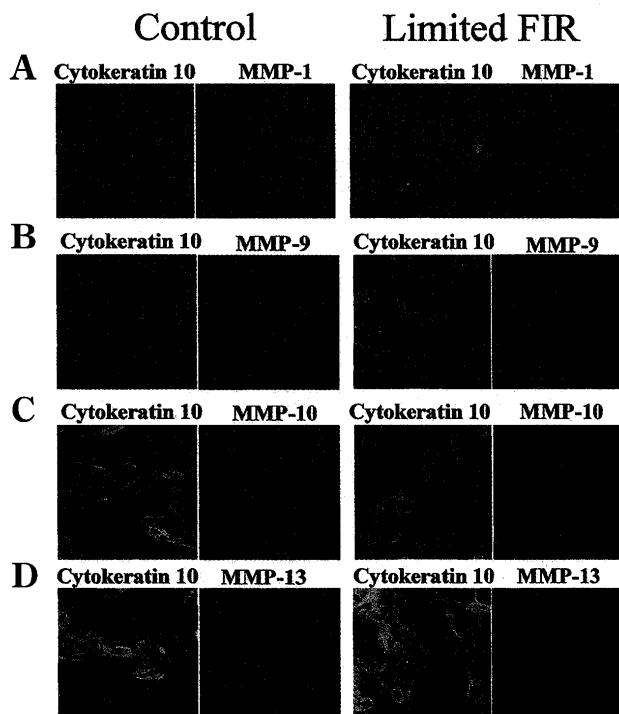


図17 A431細胞移植後30日目におけるMMPs発現の検討
特性遠赤外線照射30日後の A431腫瘍の MMPs 発現を間接蛍光抗体法にて解析を行った。Limited FIR 群に比べコントロール群で MMP-1 (A), MMP-9 (B), MMP-10 (C), MMP-13 (D) は、腫瘍実質に強く発現していた。また、本研究で用いた cyokeratin 10 抗体はヒト特異抗体を用いた。

胞が高温に弱い性質を利用して²¹⁻²³⁾、癌細胞をアポトーシスに誘導する治療法である²⁴⁾。常温域の遠赤外線と癌に関する報告では、最近 *in vitro* において波長域 4 ~ 16 μm の遠赤外線を放射する竹炭粉末により HeLa 細胞の増殖が、ミトコンドリアの脱水素酵素活性を指標とした WST-1 法にて抑制されたことが報告されている⁵⁾。また、*in vivo* における報告では、波長域 4 ~ 25 μm の遠赤外線が、ケージ庫内温度 26 ~ 27 °C の環境下で、自然乳癌高発系 SHN マウスの乳癌の増殖を抑制したとの報告がある¹⁵⁾。このように、常温域での遠赤外線照射が癌細胞の増殖を抑制した報告はあるが、細胞レベルおよび個体レベルで十分に検討を行った報告はほとんどない。本研究では、特性遠赤外線照射が癌細胞の増殖に何らかの影響を与える可能性に着目し、まず、細胞増殖能の検討を行った。その結果、特性遠赤外線照射は *in vitro* では、HSC3 と Sa3 細胞の増殖を抑制したが A431 細胞の増殖は抑制しなかった。特性遠赤外線照射により HSC3 細胞では主として細胞周期が G2/M 期で遅延し、Sa3 細胞においてはわずかであるが壊死細胞の増加が認められた。特性遠赤外線は、これらの現象を介して HSC3 と Sa3 細胞の増殖を抑制する可能性が考えられた。また、いずれの癌細胞においても *in vitro* において特性遠赤外線の照射により明らかなアポトーシスの誘導は認められなかった。このとからも、本研究で用いた特性遠赤外線照射による癌細胞の増殖抑制効果は、温熱療法による増殖抑制効果とは異なるものと考えられた。

次に、遠赤外線が電磁波の一種であることから細胞に何らかの影響を与えていた可能性に着目し、特性遠赤外線照射下における癌細胞の HSPs の発現について検討を行った。HSPs は、8 ~ 170 kD の分子量を有する巨大なスーパーファミリーをなしており、その分子量から HSP27, HSP60, HSC70, HSP70A, HSP70B, HSP70C および HSP90α, HSP90β ほかたくさんの蛋白質が存在する²⁵⁾。さまざまな HSPs が存在する中、特に HSP70 蛋白質は、癌細胞に高く発現し²⁶⁻²⁹⁾ さまざまなストレスに対して幅広い細胞保護効果を有することが報告されている³⁰⁻³⁵⁾。例えば、HSP70 蛋白質の発現の上昇は、致死的高熱、内毒素、紫外線、一酸化窒素や心筋虚血などのストレスから細胞を保護することが報告されている³⁰⁻³⁴⁾。さらに、*Hsp70* 遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックマウスを用いた研究では、致死的高熱や虚血に対して抵抗性を生じたとの報告もある^{32, 33)}。その HSP70 蛋白質の保護メカニズムについては、HSP70 蛋白質による保護効果が細胞内 pH, cyclic AMP, Ca²⁺, Na⁺, イノシトール 3 リン酸、プロテインキナーゼ C やタンパクリリン酸化酵素のようなシグナル伝達物質によって調節されている可能性があるとの報告がある¹³⁾。しかしながら、HSP70 蛋白質が遠赤外線に対して細胞保護作用を有するかどうかについては知られていない。本研究では、*Hsp70A* mRNA および内在する HSP70 蛋白質の発現量が

高い A431 細胞では、特性遠赤外線照射による細胞増殖の影響はほとんど受けず、HSP70 蛋白質の発現量が低い HSC3 および Sa3 細胞は、特性遠赤外線照射により増殖が抑制される可能性が考えられた。そこで、HSP70 蛋白質が特性遠赤外線照射による増殖抑制作用から細胞を保護する効果を有するかどうかを検討するため、*Hsp70A* 遺伝子を A431 および HSC3 細胞に過剰発現させ、特性遠赤外線照射下に細胞増殖能の検討を行った。その結果、特性遠赤外線照射により細胞増殖抑制効果の認められた HSC3 細胞で、その抑制効果が認められなくなった。このことから過剰に発現した HSP70 蛋白質が、特性遠赤外線による増殖抑制作用を阻害することが示唆された。このことに関して、温熱刺激後に中心体の変性が生じ、細胞分裂の遅延が引き起こされることが報告されている³⁶⁾。その温熱刺激による細胞分裂の遅延が HSP70 蛋白質を過剰発現させることにより、HSP70 蛋白質が変性した中心体の機能を回復させ、細胞分裂を正常にしたとの報告がある³⁶⁾。また、さまざまなストレス刺激により細胞内に増加した折りたたまれていないまたは変性した蛋白質を HSP70 蛋白質が処理し、効率的にストレス刺激によるアポトーシスや細胞壊死から細胞を保護したとの報告もある³⁵⁾。また、*Hsp70A* 遺伝子を過剰発現させた A431 および HSC3 細胞で細胞増殖能の促進が認められた。このことに関して、HSP70 蛋白質の過剰発現は、ヒト乳癌において細胞増殖の促進や分化能の低下やリンパ節転移、予後の不良および化学療法や放射線治療、温熱療法に対する抵抗性などが報告されており³⁷⁻⁴¹⁾、その報告と関連しているものと考えられた。そのほか、本実験結果は、*Hsp70* 遺伝子を過剰発現させた MCF-7 細胞で細胞倍加時間が早くなるとの報告⁴¹⁾ と一致するものであるが、HSP70 蛋白質の細胞周期における役割や細胞増殖に及ぼす影響については、はっきりとは分かっていない⁴¹⁾。また、HSP70 蛋白質は、アポトーシスの誘導を抑制することで細胞増殖を促進するとの報告もある⁴²⁾。

さらに、RNAi 法により *Hsp70A* および *Hsp70C* 遺伝子の発現を抑制したときの細胞増殖能の検討を行った。その結果、特性遠赤外線照射により増殖が抑制されなかった A431 細胞で特性遠赤外線照射により BrdU の取り込みが抑制された。この点に関して、HSP70 蛋白質は分子シャペロンとして細胞の生存や増殖に必須の蛋白質で⁴³⁾、*Hsp70* アンチセンスオリゴにより HSP70 蛋白質の発現を抑制し、熱ショックを与えるとアポトーシスの誘導が促進されたとの報告がある²⁷⁾。それゆえ、HSP70 蛋白質発現抑制下に特性遠赤外線を照射することにより、癌細胞にアポトーシスが誘導されている可能性が考えられた。これらの研究から、特性遠赤外線照射は、*in vitro* において特定の癌細胞の増殖を抑制し、その効果は、内在する HSP70 蛋白質の発現量に影響されることが示唆された。

次に、常温域の特性遠赤外線照射がマウスに移植した

腫瘍に与える効果について検討を行った。本研究においては、A431腫瘍およびSa3腫瘍とともに特性遠赤外線照射により増殖が抑制されることが明らかになった。A431腫瘍についてマイクロアレー解析および定量Real-time RT-PCRを行った結果、MMP-1, -13がmRNAレベルで特性遠赤外線照射により抑制された。さらに、MMP-1, -9, -10, -13について免疫組織学的検索を行った結果、これらMMPsの発現が特性遠赤外線照射により抑制された。つまり、MMP-9, -10の発現レベルはmRNAレベルでは明らかな差を認めなかつたが、特性遠赤外線照射により蛋白質レベルで有意に抑制された。MMPsは、約20種類からなる遺伝子グループを形成し、コラーゲンなどの細胞外マトリックスを分解する⁴⁴⁾。さらに、MMPsの発現上昇は腫瘍の浸潤、転移や増殖、脈管形成に関与している^{45, 46)}。MMP-1発現と腫瘍細胞の浸潤、転移における役割について、MMP-1は基底膜の構成要素の1つであるエンタクチンの分解を介して癌細胞の浸潤に重要な役割を果たしていることが報告されている⁴⁷⁾。また、大腸癌や食道癌でMMP-1の発現は、癌細胞の浸潤や予後不良と相関していることが報告されている^{48, 49)}。MMPsの中でも基底膜の主成分であるIV型コラーゲンを主な基質とするMMP-2, -9は、癌浸潤に伴う組織破壊に重要な役割を果たしていると考えられている⁴⁴⁾。MMP-10は、広い基質特異性を有することが知られており、MMP-10発現はT細胞性リンパ腫の腫瘍増殖を促進することが報告されているが、他の腫瘍の増殖におけるMMP-10の役割については知られていない⁵⁰⁾。MMP-13は、乳癌組織や関節炎患者の関節軟骨に高発現をしており、高いコラゲナーゼ、ゼラチナーゼ活性を有しており、関節軟骨の破壊や乳癌の進展に重要な役割を果たしている⁵¹⁾。以上のことから特性遠赤外線照射は、A431腫瘍のMMPs発現を抑制することにより腫瘍の浸潤および増殖を抑制することが示唆された。なお、本研究では直接MMPsの酵素活性を測定していないので、今後、特性遠赤外線照射によりこれら酵素活性が抑制されるかどうか検討する必要がある。

次に、特性遠赤外線照射によりSa3腫瘍の増殖が抑制された点について、特性遠赤外線照射群で一部アポトーシスの誘導が認められた。In vitroにおいて、Sa3細胞で明らかなアポトーシスの誘導が認められなかつたにもかかわらず、in vivoでアポトーシスが誘導された点について、in vitroでの照射時間は7日間と短期間である一方、in vivoでの照射時間は30日間と照射時間が長期間であるためにin vivoでアポトーシスが誘導されたものと考えられた。現在、遠赤外線照射による癌細胞のアポトーシス誘導に関する報告はなく、今後詳細な検討が必要と思われる。

結論

本研究において特性遠赤外線照射による癌細胞の動態

についてin vitroおよびin vivoにおいて検討し、以下の結果を得た。

In vitroにおいては、特性遠赤外線照射により

1. HSC3およびSa3細胞の増殖を抑制したが、A431細胞の増殖にはほとんど影響を与えたなかった。
2. いずれの癌細胞においてもアポトーシスを誘導しなかつた。
3. HSC3細胞は、主として細胞周期のG2/M期での遅延により増殖が抑制され、Sa3細胞ではわずかな壞死細胞の増加と細胞周期のG2/M期での一部遅延により増殖が抑制されることが示唆された。
4. 3種の癌細胞のうち、A431細胞でHsp70A mRNAおよび内在性のHSP70蛋白質の発現量が最も高かった。

5. HSC3細胞においてHsp70A遺伝子を過剰発現させることにより、特性遠赤外線照射による細胞増殖抑制効果が緩和された。また、Hsp70AおよびHsp70C遺伝子をノックダウンさせたA431細胞では、特性遠赤外線照射による細胞増殖の抑制が認められた。

In vivoにおいては、特性遠赤外線照射により

1. A431およびSa3マウス移植腫瘍とともに有意にその増殖が抑制された。
2. A431マウス移植腫瘍のMMP-1, MMP-13の発現がmRNAレベルで、またMMP-1, MMP-9, MMP-10, MMP-13の発現が蛋白質レベルで有意に抑制された。
3. Sa3マウス移植腫瘍では、顕著な腫瘍の増生は抑制され、一部にアポトーシスの誘導を認めた。

以上のことから、特性遠赤外線照射は、in vitroにおいて常温下で細胞周期のG2/M期での遅延やわずかな壞死細胞の増加により特定の癌細胞の増殖を抑制し、その効果は、内在するHSP70蛋白質の発現量に影響されることが示唆された。In vivoにおいて、A431マウス移植腫瘍はMMP群の発現を抑制することにより、またSa3マウス移植腫瘍では一部にアポトーシスを誘導することにより、腫瘍の増殖を抑制するものと考えられた。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究課題を与えられ御指導、御校閲を賜った徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔顎面外科学分野 長山 勝教授に深甚なる謝意を表しますとともに、懇切なる御校閲、御助言をいただきました口腔顎面形態学分野 北村清一郎教授、分子医化学分野 野間隆文教授に深謝いたします。また、本研究の実施に際し終始、直接御指導いただいた口腔顎面形態学分野 山下菊治助教授に心から謝意を表しますとともに、本研究の円滑な進展に特別の配慮を戴いた口腔顎面外科学分野および口腔顎面形態学分野の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 高田 紘一, 江川 芳信, 佐々木 久夫: 実用遠赤外線. 初版, 東京, 人間と歴史社, 1999, 51-446
- 2) Ogita S, Imanaka M, Matsuo S, Takebayashi T, Nakai Y, Fukumasu H, Matsumoto M and Iwanaga K: Effects of far-infrared radiation on lactation. Ann Physiol Anthropol 9, 83-91 (1990)
- 3) Inoue S, Kabaya M: Biological activities caused by far-infrared radiation. Int J Biometeorol 33, 145-150 (1989)
- 4) Silverstein RM, Bassler GC, Morril TC: 有機物のスペクトルによる同定法. 第4版, 東京, 東京化学同人, 1983, 90-152
- 5) Teraoka F, Hamada Y and Takahashi J: Bamboo charcoal inhibits growth of HeLa cells *in vitro*. Dent Mater J 23, 633-637 (2004)
- 6) Mongpraneet S, Abe T and Tsurusaki T: Accelerated drying of welsh onion by far infrared radiation under vacuum condition. J Food Eng 55, 147-156 (2002)
- 7) Udagawa Y, Nagasawa H: Effects of far-infrared ray on reproduction, growth, behaviour and some physiological parameters in mice. In Vivo 14, 321-326 (2000)
- 8) Honda K, Inoue S: Sleep-enhancing effects of far-infrared radiation in rats. Int J Biometeorol 32, 92-94 (1988)
- 9) Toyokawa H, Matsui Y, Uhara J, Tsuchiya H, Teshima S, Nakanishi H, Kwon AH, Azuma Y, Nagaoka T, Ogawa T and Kamiyama Y: Promotive effects of far-infrared ray on full-thickness skin wound healing in rats. Exp Biol Med (Maywood) 228, 724-729 (2003)
- 10) Shimura Y: Measurement of warming effect of far-infrared radiation by agar. Res Note Jpn Res Lat Sleep Sci 0284, 1-6 (1988)
- 11) Udagawa Y, Nagasawa H and Kiyokawa S: Inhibition by whole-body hyperthermia with far-infrared rays of the growth of spontaneous mammary tumors in mice. Anticancer Res 19, 4125-4130 (1999)
- 12) Udagawa Y and Nagasawa H: Effects of combined treatment with coffee cherry and whole-body hyperthermia on the growth of spontaneous mammary tumors in SHN mice. In Vivo 14, 431-435 (2000)
- 13) Udagawa Y, Inada K and Nagasawa H: Inhibition by single whole-body hyperthermia with glucose administration of the growth of spontaneous mammary tumors in mice. Jpn J Hyperthermic Oncol 16, 229-236 (2000)
- 14) Nagasawa H, Inada K, Ishigame H and Kusakawa S: Different schedules of whole-body hyperthermia with or without glucose for the inhibition of mammary tumors and uterine adenomysis in SHN mice. Bull Sch Agr, Meiji Univ 127, 43-51 (2001)
- 15) Nagasawa H, Udagawa Y and Kiyokawa S: Evidence that irradiation of far-infrared rays inhibits mammary tumour growth in SHN mice. Anticancer Res 19, 1797-1800 (1999)
- 16) Udagawa Y, Ishigame H and Nagasawa H: Effects of hydroxyapatite in combination with far-infrared rays on spontaneous mammary tumorigenesis in SHN mice. Am J Chin Med 30, 495-505 (2002)
- 17) Servadio C and Leib Z: Local hyperthermia for prostate cancer. Urology 38, 307-309 (1991)
- 18) Kaver I, Ware JL and Koontz WW Jr: The effect of hyperthermia on human prostatic carcinoma cell lines: Evaluation *in vitro*. J Urol 141, 1025-1027 (1989)
- 19) Roigas J, Wallen ES, Loening SA and Moseley PL: Effects of combined treatment of chemotherapeutics and hyperthermia on survival and the regulation of heat shock proteins in Dunning R3327 prostate carcinoma cells. Prostate 34, 195-202 (1998)
- 20) Paulus JA, Tucker RD, Flanagan SW, Moseley PL, Loening SA and Park JB: Heat shock protein response in a prostate tumor model to interstitial thermotherapy: Implications for clinical treatment. Prostate 23, 263-270 (1993)
- 21) Fukao H, Ikeda M, Ichikawa T, Inufusa H, Okada K, Ueshima S and Matsuo O: Effects of hyperthermia on the viability and the fibrinolytic potential of human cancer cell lines. Clin Chim Acta 296, 17-33 (2000)
- 22) Bonay M, Soler P, Riquet M, Battesti JP, Hance AJ and Tazi A: Expression of heat shock proteins in human lung and lung cancers. Am J Respir Cell Mol Biol 10, 453-461 (1994)
- 23) Gress TM, Muller-Pillasch F, Weber C, Lerch MM, Friess H, Buchler M, Beger HG and Adler G: Differential expression of heat shock protein in pancreatic carcinoma. Cancer Res 54, 547-551 (1994)
- 24) Vertrees RA, Das GC, Coscio AM, Xie J, Zwischenberger JB and Boor PJ: A mechanism of hyperthermia-induced apoptosis in ras-transformed lung cells. Mol Carcinog 44, 111-121 (2005)
- 25) Somji S, Todd JH, Sens MA, Garrett SH and Sens DA: Expression of the constitutive and inducible forms of heat shock protein 70 in human proximal tubule cells exposed to heat, sodium arsenite, and CdCl₂. Environ Health Perspect 107, 887-893 (1999)
- 26) Rohde M, Daugaard M, Jensen MH, Helin K, Nylandsted J and Jaattela M: Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. Genes Dev 19, 570-582 (2005)
- 27) Zhao ZG, Shen WL: Heat shock protein 70 antisense oligonucleotide inhibits cell growth and induces

- apoptosis in human gastric cancer cell line SGC-7901. *World J Gastroenterol* 11, 73-78 (2005)
- 28) Ciocca DR and Calderwood SK: Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 10, 86-103 (2005)
- 29) Roigas J, Wallen ES, Loening SA and Moseley PL: Effects of combined treatment of chemotherapeutics and hyperthermia on survival and the regulation of heat shock proteins in Dunning R3327 prostate carcinoma cells. *Prostate* 34, 195-202 (1998)
- 30) Bellmann K, Jaattela M, Wissing D, Burkart V and Kolb H: Heat shock protein hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide. *FEBS Lett* 391, 185-188 (1996)
- 31) Wong HR, Menendez IY, Ryan MA, Denenberg AG and Wispe JR: Increased expression of heat shock protein-70 protects A549 cells against hyperoxia. *Am J Physiol* 275, L836-L841 (1998)
- 32) Marber MS, Mestril R, Chi SH, Sayen MR, Yellon DM and Dillmann WH: Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest* 95, 1446-1456 (1995)
- 33) Plumier JC, Ross BM, Currie RW, Angelidis CE, Kazlaris H, Kollias G and Pagoulatos GN?: Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery. *J Clin Invest* 95, 1854-1860 (1995)
- 34) Kiang JG and Tsokos GC: Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther* 80, 183-201 (1998)
- 35) Jaattela M: Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann Med* 31, 261-271 (1999)
- 36) Hut HMJ, Kampinga HH and Sibon OCM: Hsp70 protects mitotic cells against heat-induced centrosome damage and division abnormalities. *Mol Biol Cell* 16, 3776-3785 (2005)
- 37) Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SA, Welch WJ and McGuire WL: Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *J Natl Cancer Inst* 85, 570-574 (1993)
- 38) Lazaris ACh, Chatzigianni EB, Panoussopoulos D, Tzimas GN, Davaris PS and Golematis B: Proliferating cell nuclear antigen and heat shock protein 70 immunolocalization in invasive ductal breast cancer not otherwise specified. *Breast Cancer Res Treat*. 43, 43-51 (1997)
- 39) Vargas-Roig LM, Fanelli MA, Lopez LA, Gago FE, Tello O, Aznar JC and Ciocca DR: Heat shock proteins and cell proliferation in human breast cancer biopsy samples. *Cancer Detect Prev* 21, 441-451 (1997)
- 40) Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O, Aznar JC and Ciocca DR: Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int J Cancer* 79, 468-475 (1998)
- 41) Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A, Fehrenbacher N, Lademann U, Hoyer-Hansen M, Weber E, Multhoff G, Rohde M and Jaattela M: Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J Exp Med* 200, 425-435 (2004)
- 42) Jolly C and Morimoto RI: Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* 92, 1564-1572 (2000)
- 43) Barnes JA, Dix DJ, Collins BW, Luft C and Allen JW : Expression of inducible Hsp70 enhances the proliferation of MCF-7 breast cancer cells and protects against the cytotoxic effects of hyperthermia. *Cell Stress Chaperones* 6, 316-325 (2001)
- 44) Robinson CM, Stone AM, Shields JD, Huntley S, Paterson IC and Prime SS: Functional significance of MMP-2 and MMP-9 expression by human malignant oral keratinocyte cell lines. *Arch Oral Biol* 48, 779-786 (2003)
- 45) Sossey-Alaoui K, Ranalli TA, Li X, Bakin AV and Cowell JK: WAVE3 promotes cell motility and invasion through the regulation of MMP-1, MMP-3, and MMP-9 expression. *Exp Cell Res* 308, 135-145 (2005)
- 46) Jia Y, Zeng ZZ, Markwart SM, Rockwood KF, Ignatoski KM, Ethier SP and Livant DL: Integrin fibronectin receptors in matrix metalloproteinase-1-dependent invasion by breast cancer and mammary epithelial cells. *Cancer Res* 64, 8674-8681 (2004)
- 47) Sires UI, Griffin GL, Broekelmann TJ, Mecham RP, Murphy G, Chung AE, Welgus HG and Senior RM: Degradation of entactin by matrix metalloproteinases. Susceptibility to matrilysin and identification of cleavage sites. *J Biol Chem* 268, 2069-2074 (1993)
- 48) Murray GI, Duncan ME, O'Neil P, Melvin WT and Fothergill JE: Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Nat Med* 2, 461-462 (1996)
- 49) Murray GI, Duncan ME, O'Neil P, McKay JA, Melvin WT and Fothergill JE: Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in oesophageal cancer. *J Pathol* 185, 256-261 (1998)
- 50) Van Themsche C, Alain T, Kossakowska AE, Urbanski S, Potworowski EF and St-Pierre Y: Stromelysin-2 (matrix metalloproteinase 10) is inducible in lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors in vivo. *J*

Immunol 173, 3605-3611 (2004)

- 51) Pendas AM, Balbin M, Llano E, Jimenez MG and Lopez-Otin C: Structural analysis and promoter characterization of the human collagenase-3 gene (MMP13). Genomics 40, 222-233 (1997)