
学位論文

ヒト癌細胞株における遠赤外線効果の遺伝子発現解析

石橋 淳

キーワード: 遠赤外線, 癌, Activating transcription factor 3 (ATF3)

Gene Expression Profiling of Far Infrared Radiation Effect in Human Cancer Cell Lines

Jun ISHIBASHI

Abstract: Far-infrared radiation (FIR) is electromagnetic radiation with wavelengths between 4 and 1000 μm . The available evidence indicates that *in vivo* and *in vitro* irradiation by FIR has many biological effects, but how it affects cells is not well understood. Our previous studies using A431, HSC3 and Sa3 cells suggested that FIR inhibited cell proliferation by delaying the cell cycle in the G₂/M stage in HSC3 cells, while necrotic cells of Sa3 cells slightly increased. In addition, the basal expression of HSP70 was higher in FIR-insensitive A431 cells than in FIR-sensitive HSC3 and Sa3 cells, suggesting that the suppressive effect of FIR depends on HSP70 expression level *in vitro*. During *in vivo* analysis, FIR inhibited tumor growth in the A431 tumorigenesis model mouse by inhibiting the expression of matrix metalloprotease-1, 9, 10, and 13. In this study, we used a tissue culture incubator that can continuously irradiate cells with FIR, and we used it to examine the effects of a body temperature range of FIR on five human cancer cell lines, namely A431 (vulva), A549 (lung), HSC3 (tongue), MCF7 (breast), and Sa3 (gingiva). We found that FIR inhibits cell proliferation and induces cell hypertrophy in A549, HSC3, and Sa3 cells. In contrast, FIR did not inhibit cell proliferation, or cause cell hypertrophy in A431 or MCF7 cells. Also, FIR did not cause apoptosis in any of the five cell lines tested. cDNA microarray analysis revealed that FIR suppressed the expression of cell proliferation-related and stress-responsive genes in FIR-sensitive cell lines (A549, HSC3, and Sa3). Additionally, ATF3, in particular, was identified as a key mediator of the FIR effect. Overexpression of ATF3 inhibited the cell proliferation of A431, HSC3, and Sa3 cells, and knockdown of ATF3 mRNA using an antisense oligonucleotide suppressed FIR-induced growth arrest in HSC3 cells. In addition, the basal expression level of HSP70A mRNA was higher in A431 and MCF7 cells than in the FIR-sensitive A549, HSC3 and Sa3 cells. Also, HSP70A showed a high correlation with the growth rate out of the 35 HSP genes on the microarray. These results indicate that the body temperature range of FIR radiation suppresses the proliferation of A549, HSC3, and Sa3 cells, and it appears that ATF3 and HSP70 play important roles in this effect.

緒 言

遠赤外線 (Far-infrared Ray, 以下, FIR と略記する) はX線, 紫外線, 可視光線などと同じ電磁波の一種であり, 4~1000 μm の範囲の波長と定義されている (JIS, 日本工業規格)。中でも, 7~20 μm の領域は蛋白質や糖鎖, 脂質などの生体高分子における分子結合の共鳴波長と一致する^{1,2)} ことから, FIR が生体に最もよく吸収される波長とされ, 生体への影響は強いと考えられている。特に, 癌細胞は正常細胞より温熱感受性が高く^{3,4)}, 温熱効果を主とする FIR の癌治療への応用について活発に研究が進められている。温熱効果に関する研究では, *in vivo* の高温域で, 自然乳癌高発系 SHN マウスにおける乳癌増殖の抑制^{5,6)}, ラット皮膚の微小循環の促進⁷⁾, ヒトやマウスの深部体温の上昇⁸⁻¹⁰⁾ 等の報告がある。さらに, 常温域では, FIR の線源に竹炭を用いた *in vitro* の実験で, HeLa 細胞の増殖抑制が報告されている¹⁾。In vivo では, 常温域においても, 自然乳癌高発系 SHN マウスにおける乳癌増殖抑制効果^{11,12)} や, ラット皮膚の創傷治癒促進効果¹³⁾ などが報告されている。しかし, これらの作用機構についてはまったく解明されていない。

我々は以前より, 遠赤外線の微弱エネルギーの有効性と社会的要求, 応用分野の多様性の観点から, 常温域での FIR の生体への影響について着目し, FIR 照射細胞培養装置¹⁴⁾ ならびに FIR 照射動物飼育装置¹⁵⁾ を開発してきた。また, 細川¹⁶⁾ により, FIR が細胞周期の G₂/M 期での遅延, および壊死細胞をわずかに増加させることで, 舌癌および歯肉癌細胞の増殖を *in vitro* で抑制すること, その抑制効果が内在性の heat shock protein 70 (以下, HSP70 と略記する) の発現量が高い細胞では阻害されること, さらに, *in vivo* ではマウス背部皮下に移植したヒト外陰部癌の腫瘍増殖を抑制することが報告された。しかし, これら FIR の抑制機構については未だ不明な点が多い。

そこで本研究では, FIR がヒト癌細胞株に及ぼす影響を, 遺伝子発現の点から明らかにすること, および様々な由来組織の癌細胞における FIR 感受性の差を明らかにすること, および FIR の作用機構を明らかにすることを目的に, *in vitro* において, これまで用いた3種類のヒト癌細胞株に, 新たに由来組織の異なる2種類のヒト癌細胞株を加えて網羅的な遺伝子解析を行うとともに, その結果から, FIR による増殖抑制効果に深く関与していることが示唆された activating transcription factor 3 (以下, ATF3 と略記する) 遺伝子について, 過剰発現実験および発現抑制実験を行い, ATF3 の細胞増殖および形態変化に及ぼす影響について検討した。さらに, これまでの研究から, FIR による増殖抑制作用との関連が示唆された HSP70 の発現動態についても検討を行った。

材料および方法

1. FIR 照射細胞培養装置

FIR の照射には, 我々のグループが開発した遠赤外線照射細胞培養装置¹⁴⁾ を用いた。線源として用いたセラミックスは, 炭素, ケイ素, 酸化アルミナ, 二酸化チタンを含有し, FIR の照射効率が97%以上を示す。このセラミックスより照射される FIR の分光放射輝度はフーリエ変換赤外分光光度計 FTIR JIR-5500 (日本電子, 東京) と赤外放射測定ユニット IR-IRR200 (日本電子) により測定され, 40°C に加熱した際に波長域が4~20 μm , ピークが7~12 μm の FIR を放射することが確認されている。培養装置内は湿度100%, 37°C, 5% CO₂, 95% 空気の気相下に保たれ, 扉面を除く全面と培養棚はセラミックスによりコーティングされている。セラミックスはヒーターによって40°C に維持されるため, 40°C 時における4.486~20.256 μm の波長域の分光放射輝度を積分すると, 130.225 W/(m²·str) のエネルギーを発生していることがわかる。培養装置内面のセラミックス面積が1.2385 m²であり, 体積比率および消費電力から換算した結果, FIR 照射群の培養細胞が受ける熱量は0.050 J/h·cm², 非照射群 (通常の培養装置) の培養細胞が受ける熱量は0.1997 J/h·cm²であった。また, FIR 照射群が受ける熱量は, そのほぼ全てが7~12 μm にピークを有する FIR 由来のものであるが, 非照射群がニクロム線源から受ける熱量はほとんどが可視光線と近赤外線由来で, わずかながら含まれる FIR も波長域が4~5 μm であり, 本研究で着目した7~12 μm の波長域の FIR は含まれていなかった。

2. 細胞および培養法

実験には, ヒト外陰部癌由来細胞株 A431 細胞, ヒト肺腺癌由来細胞株 A549 細胞, ヒト舌癌由来細胞株 HSC3 細胞, ヒト乳癌由来細胞株 MCF7 細胞, ヒト歯肉癌由来細胞株 Sa3 細胞を用いた。A431 細胞, A549 細胞および MCF7 細胞は10% fetal bovine serum, 100 mg/ml ストレプトマイシン, 100 U/ml ペニシリン (ともに Gibco, Grand Island, NY, USA) を含む DMEM/HamF-12 培地 (Sigma, St. Louis, MO, USA) で, HSC3 細胞と Sa3 細胞は100 mg/ml ストレプトマイシン, 100 U/ml ペニシリンを含む Basal Eagle's 培地 (Sigma) で培養した。培養は37°C, 5% CO₂, 95% 空気の条件下で行った。培地は3日毎に交換した。

3. 細胞増殖能の検討

24穴プレート (Nunc, Roskilde, Denmark) に5×10⁴ 個の細胞を播種し, 0, 2, 4, 6, 8, 10日目における生細胞数を, 0.3% トリパブルー (和光純薬, 大阪) および Hemocytometer (SLGC, 東京) を用いた色素排除法で測定した。また, BrdU labeling and detection kit III (Roche, Mannheim, Germany) を用いた増殖能定量試

験も行った。すなわち、96穴プレート (Nunc) に 5×10^3 個の細胞を播種し、FIR 照射 4 日目においてコンフルエントになっていないことを確認したのち、 $10 \mu\text{M}$ の BrdU を 37°C で 4 時間取り込ませ、抗 BrdU 抗体を投与し、ImmunoMini NJ-2300 プレートリーダー (System Instruments, 東京) にて 405 nm (対照 590 nm) での吸光度を測定した。また、上記 5 種類の細胞において ATF3 mRNA をノックダウンした細胞では、WST-1 法による増殖能試験を行った。すなわち、96穴プレート (Nunc) に播種した 70% コンフルエントの細胞に、培地 $100 \mu\text{l}$ に対し $10 \mu\text{l}$ 量の WST-1 (Roche) を添加し、 37°C で 4 時間反応させた後、プレートリーダーにて 450 nm (対照 590 nm) での吸光度を測定した。

4. 細胞形態の観察

35mm デイッシュ (Nunc) に静置した $22 \times 22 \text{ mm}$ カバーガラス (松浪硝子, 大阪) 上に細胞を播種し、FIR 照射 4 日目に PBS (-) で洗浄後、10%ホルマリン PBS にて氷上で 30 分間固定し、Hematoxylin-Eosin 染色を行った。生細胞の撮影には CK40 倒立顕微鏡 (OLYMPUS, 東京) と PM-BP35 撮影装置 (OLYMPUS) を用いた。

5. Terminal deoxynucleotide transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 法によるアポトーシスの検出

FIR がアポトーシスに及ぼす影響を検討する目的で、Apo-BrdU In Situ DNA Fragmentation Assay Kit (Bio Vision, Mountain View, CA, USA) を用いて、TUNEL 法にてアポトーシスの検出を行った。すなわち、35 mm デイッシュ (Nunc) に静置した $22 \times 22 \text{ mm}$ カバーガラス上で細胞を培養し、FIR 照射 4 日目に PBS (-) で洗浄した後、10%ホルマリン PBS にて氷上で 30 分間固定した。さらに PBS (-) で洗浄した後、 $50 \mu\text{l}$ の DNA labeling solution にて 37°C で 1 時間反応させ、再び PBS (-) で洗浄し、 $100 \mu\text{l}$ の FITC 標識 anti-BrdU 抗体で室温にて 30 分間反応させ、ついで $100 \mu\text{l}$ の PI/RNase Staining Buffer で核染色を行った。アポトーシス像の観察には蛍光顕微鏡 BX51 (OLYMPUS, 東京) を用いた。アポトーシスの陽性対照には、5 分間の UV 照射 (10J 相当) を行った細胞を用いた。

6. cDNA マイクロアレイ法およびデータ解析

FIR が遺伝子発現に及ぼす影響を検討する目的で、cDNA マイクロアレイ解析を行った。培養 4 日目の FIR 照射群および非照射群の細胞から、Qiagen RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) のプロトコールに従って total RNA を抽出し、UV 分光光度計 DU530 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) にて A_{260}/A_{280} 比が 1.8 以上であることを確認した後、Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) を用いて RNA の

分解が認められないことを確認した。ついで、Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit (Agilent Technologies) を用い、各 RNA の増幅と Cy3 (非照射群)・Cy5 (FIR 群) のラベル化を行い、これらについて、19,000 個の代表的ヒト遺伝子を搭載した Agilent human 1A ver.2 microarray slides (Agilent Technologies) を用い、プロトコールに従ってハイブリダイゼーションを行った。アレイの洗浄および乾燥後、Agilent Technologies Microarray Scanner (Agilent Technologies) にて Cy3 蛍光を 670 nm 、Cy5 蛍光を 770 nm でスキャンした。データ解析には GeneSpring 7.0 software (Silicon Genetics, CA, USA) を用い、統計学的に有意な発現を示した遺伝子を抽出した。すなわち、得られた生データに対し per spot and per chip intensity-dependent (LOWESS) ノーマライゼーションを行い、次いで非照射群との発現差の p 値 < 0.01 、かつ非照射群との発現比が ± 1.5 以上のものを抽出し、さらに、そこから以下の条件 (蛍光が飽和している遺伝子、蛍光値が不均一な遺伝子、バックグラウンドの蛍光強度が不均一な遺伝子、バックグラウンドとの蛍光差がバックグラウンドの蛍光 $+ 2.6 \times \text{SD}$ 以内の遺伝子) に一つでも合致する遺伝子を全て排除し、FIR 感受性遺伝子のリストを作成した。

7. mRNA の抽出ならびに reverse transcription polymerase chain reaction (real time RT-PCR) 法

FIR 照射による ATF3 および HSP70 mRNA の発現への影響を検討するため、ATF3 と HSP70 について real time RT-PCR を行った。すなわち、培養細胞から $1 \mu\text{g}$ の全 RNA を抽出し、ランダムプライマー (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) と逆転写酵素 SS II RT[®] (Invitrogen) を加えて 42°C で 50 分間、ついで 70°C で 15 分間反応させて逆転写を行い、cDNA を作成した。用いたプライマーの配列を表 1 に示す。各遺伝子に特異的なプライマー (最終濃度 $1 \mu\text{M}$)、SYBR Green I (Roche) および MgCl_2 (最終濃度 3 mM) を混和し、LightCycler 1.5 を用いて PCR 反応を行った。PCR 反応は、 95°C 10 分で熱変性後、 95°C 10 秒、 60°C 10 秒 (HSP70 は 58°C)、 72°C 10 秒のアニーリングを 1 サイクルとし、50 サイクルを基本として、直線的な増幅反応が認められるまで行われた。デー

表 1 プライマーの塩基配列およびアニーリング温度

Gene	プライマー配列	アニーリング温度
ATF3	(F) 5'-AAACTAGGCAATGTACTCTTCCG-3'	60
	(R) 5'-ATCTTGAGATACTGCACGTGG-3'	
HSP70A	(F) 5'-TGTTCGGTTTCCAGCCCCAA-3'	58
	(R) 5'-GGGCTTGCTCCGCTGTGAT-3'	
β -actin	(F) 5'-ATAGCACAGCCTGGATAGCAACCTAC-3'	60
	(R) 5'-CACCTTCTACAATGAGCTGCGTGTG-3'	

タは LightCycler Software Ver. 3.5 (Roche) で解析され、PCR 産物の特異性は融解曲線分析で確認した。各遺伝子の発現強度は、 β -actin に対する相対的な発現量として算出した。

8. 蛋白質抽出ならびに Western blot 法

ATF3 蛋白質発現の定量には Western blot 法を用いた。すなわち、60 mm プレートに 1×10^6 個の細胞を播種し、48時間培養後、PBS (-) で2回洗浄し、氷上にて Lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM Na_2EDTA , 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na_3VO_4 , and 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin) を加え、培養細胞を溶解した。総蛋白質量の定量は、DC Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用い、Lowry 法¹⁷⁾にて行った。さらに、サンプルを加熱後、20 μg 量の蛋白質を用い、NuPAGE System (Invitrogen) による SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行い、ついで PVDF 膜に転写を行った。非特異的反応のプロッキングには5%スキムミルクと0.05% Tween20 を含んだ TBS (以下 TBS-T と略記) を用いた。続いて一次抗体として抗ヒト ATF3 ポリクローナル抗体 (c-19; Santa Cruz Biotechnology) および抗ヒト β -actin モノクローナル抗体 (Sigma) を、二次抗体として HRP-conjugated anti-mouse IgG (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, USA) と anti-rabbit IgG (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) を用い、ECL plus kit と Hyper ECL film (Amersham Biosciences) により反応蛋白質を検出した。

9. ベクターならびにトランスフェクション法

ATF3 発現ベクターは、Dr. T. Hai (Ohio State University, USA) より供与された ATF3 cDNA を、pcDNA3.1 (-) (Invitrogen) の XbaI および BamHI サイトにサブクローニングして作成した。ついで、Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用い、この発現ベクターもしくはコントロールベクター pcDNA3.1 (-) を A431 細胞、HSC3 細胞および Sa3 細胞にトランスフェクションし、さらに培地中に 400 $\mu\text{g/ml}$ の G418 (Sigma) を加えてセレクションを行うことにより、それぞれ ATF3 過剰発現株と empty vector 導入株を得た。

10. アンチセンスオリゴ法

HSC3 細胞に対し、アンチセンスオリゴ法による ATF3 遺伝子のノックダウンを行った。すなわち、ATF3 mRNA に対するセンス鎖およびアンチセンス鎖の配列は Zhang らの報告¹⁸⁾ に従って作成し、これらに加え、(5'-ACGCAGGTGTACTCGGACCAGAGTAGTTGT-3') に設計したスクランブルオリゴヌクレオチドを、96穴プレートに播種し、24時間後に Lipofectamine2000 を用いてトランスフェクションを行った。48時間後に2度目の

トランスフェクションを行い、さらに48時間後に前述の real time RT-PCR 法および WST-1 assay を行い、遺伝子発現および増殖能を検討した。

11. 統計学的解析

得られたデータは平均値 \pm 標準偏差で表し、2群の比較には student-t 検定を、多重比較検定には ANOVA を行った後、Tukey-Kramer 法を用いて有意差検定を行い、それぞれ $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1. 遠赤外線照射が細胞増殖に及ぼす影響

5種類の培養ヒト癌細胞株について生細胞数を測定し、FIR 照射が増殖に与える影響を検討した。その結果、A549 細胞、HSC3 細胞および Sa3 細胞において6日目以降から有意な増殖抑制が認められたが、A431 細胞と MCF7 細胞では増殖抑制は認められなかった (図1A)。また、FIR 照射は A549 細胞、HSC3 細胞および Sa3 細胞において BrdU の取り込みを有意に抑制したが、A431 細胞と MCF7 細胞では明らかな差を認めなかった (図1B)。

2. 遠赤外線照射が細胞形態に及ぼす影響

FIR 照射が細胞形態に及ぼす変化を HE 染色にて観察した。A549 細胞では全体的に、HSC3 細胞と Sa3 細胞では一部の細胞に、細胞質および核の肥大化が認められた。一方、A431 細胞と MCF7 細胞では細胞形態に顕著な変化は認められなかった (図2)。

3. 遠赤外線照射によるアポトーシス誘導の検討

FIR 照射がアポトーシスに与える影響を検討するため、TUNEL 染色により、FIR 照射4日目におけるアポトーシスの検出を行った (図3A)。5種類の細胞株において照射4日目のアポトーシス細胞数の割合を算出したが、いずれの細胞においても、アポトーシス細胞数の割合に有意な増加は認められなかった (図3B)。

4. 遠赤外線照射が遺伝子発現に及ぼす影響の検討

FIR 照射が癌細胞株の遺伝子発現に与える影響を網羅的に解析するため、約19,000遺伝子が搭載された cDNA マイクロアレイによる解析を行った。5種類の細胞株において、それぞれ非照射群と FIR 照射群との間で発現が有意に変動する遺伝子を検索した結果、FIR 照射で細胞増殖が抑制された細胞株ほど多くの遺伝子が変動する傾向があり、また、HSC3 細胞を除き、FIR 照射で発現が促進された遺伝子より、抑制された遺伝子の数の方が多かった (表2)。このうち、各細胞株で、FIR 照射により発現が最も促進された10遺伝子と、最も抑制された10遺伝子を表3に示した。5種類の細胞株間で共通した発現を示す遺伝子は存在しなかった。また、これらの遺

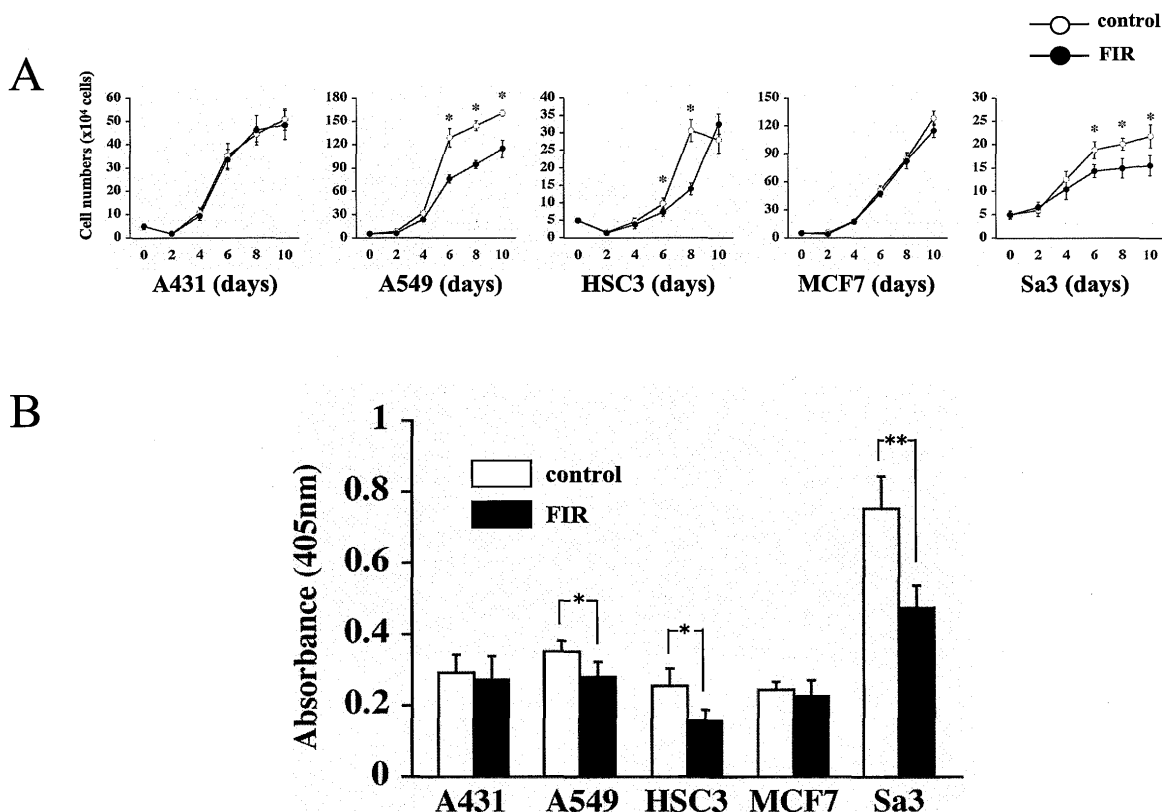


図1 遠赤外線照射が細胞増殖に及ぼす影響

A: 5種のヒト癌細胞を24穴ディッシュに 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±標準偏差を示す。A549細胞、HSC3細胞、およびSa3細胞において、それぞれ遠赤外線照射6日目以降から有意な増殖の低下が認められた。(n=4, *p<0.05) 一方、A431細胞とMCF7細胞においては遠赤外線照射10日目まで有意な増殖の低下は認められなかった。B: Aと同じ細胞群における遠赤外線照射4日目でのBrdU取り込み能を示す。細胞数測定の結果と同様に、A549細胞、HSC3細胞、およびSa3細胞において、有意な取り込み能の低下が認められた。(n=6, *p<0.05, **p<0.01)

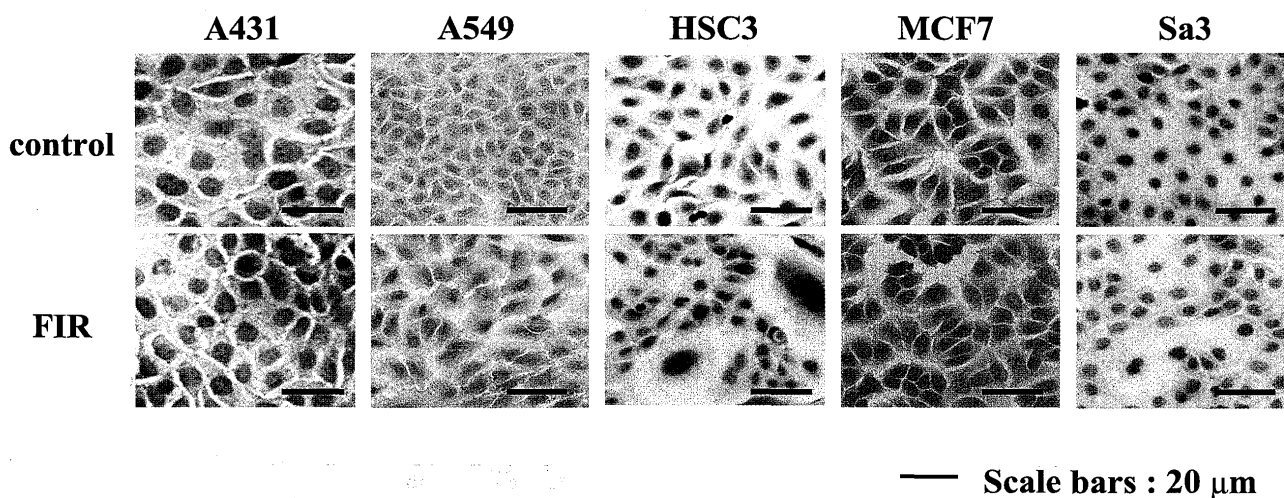
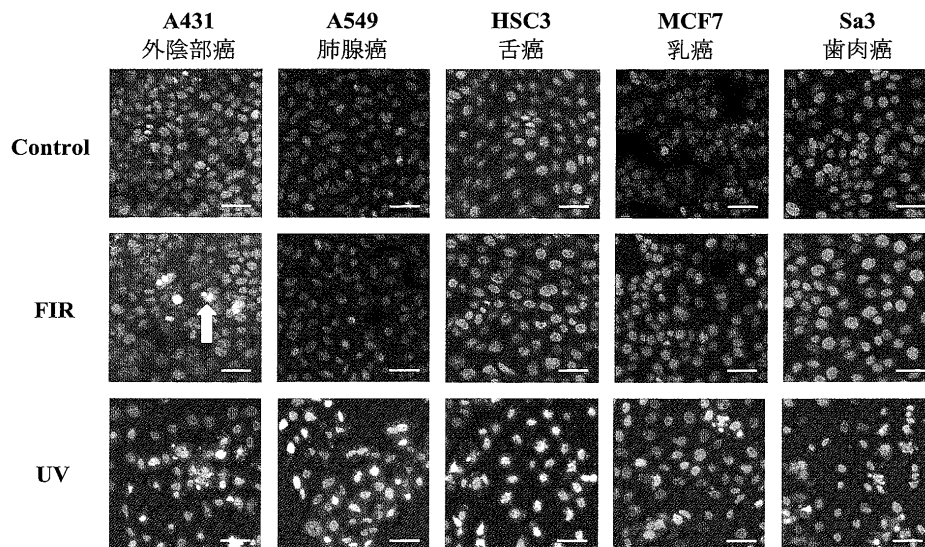


図2 遠赤外線照射が細胞形態に及ぼす影響

FIR照射4日目における細胞形態の変化をHE染色によって観察した。(バー:20μm) A549細胞においては全体的に、HSC3細胞とSa3細胞においては一部の細胞に、細胞質および核の肥大化が認められた。一方、A431細胞とMCF7細胞においては細胞形態に顕著な変化は認めなかった。

A

TUNEL染色



B

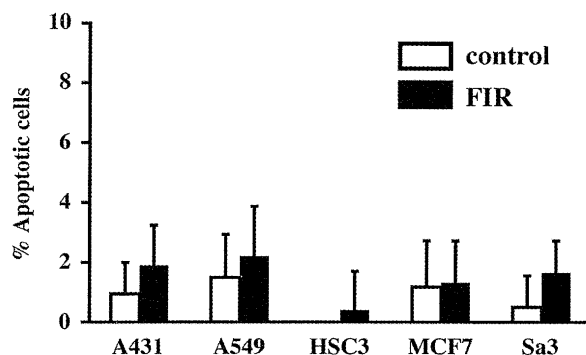


図3 TUNEL染色法によるアポトーシスの検出

A: 5種類のヒト癌細胞を6穴ディッシュに 1×10^5 個ずつ播種し、TUNEL染色によりFIR照射4日目におけるアポトーシスの検出を行った。(バー: 20 μ m) 陽性対照として5分間の紫外線照射群を用いた。矢印はFITC染色性のアポトーシス細胞を示す。

B: 無作為抽出した10視野における、全細胞数に対するアポトーシス細胞数の割合を算出した。各値は平均値 \pm 標準偏差を示す。

表2 cDNA マイクロアレイ法による細胞間での遠赤外線反応遺伝子数の比較

5種類の細胞各々について、FIR照射によりマイクロアレイ上で発現が有意に変動した遺伝子の数を示した。(コントロール群に対し、発現が ± 1.5 倍以上、 $p < 0.01$) FIR照射で細胞増殖が抑制された細胞株ほど多くの遺伝子の変動する傾向があり、また、HSC3細胞を除き、FIR照射で促進された遺伝子より、抑制された遺伝子の数が多かった。

	A431 外陰部癌	A549 肺癌	HSC3 舌癌	MCF7 乳癌	Sa3 歯肉癌	計
発現促進	4	55	68	10	13	150
発現抑制	28	111	30	23	21	213
計	32	166	98	33	34	363

表3 cDNA マイクロアレイ法による各細胞株における FIR 反応遺伝子

FIR 照射 4 日目において、コントロール群に対して発現が最も促進された10遺伝子と、最も抑制された10遺伝子を示した。マイナスで示されたものは FIR 照射群で発現が抑制された遺伝子を示した。値は FIR 照射群の mRNA 発現量をコントロール群の mRNA 発現量で除算したものを示す。5 種類の細胞間で共通した発現を示す遺伝子は存在しなかった。また、これらの遺伝子の中には、総じて転写因子や転写調節因子が多く含まれていた。

A431			MCF7		
Genbank	Description	Fold change	Genbank	Description	Fold change
NM_014316	calcium regulated heat stable protein 1, 24kDa	1.777	NM_006743	RNA binding motif (RNP1, RRM) protein 3	2.793
AJ131186	PRP19/PSO4 pre-mRNA processing factor 19 homolog	1.754	NM_012403	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member C	2.763
NM_007056	splicing factor, arginine/serine-rich 16	1.706	NM_012404	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member D	2.583
NM_003824	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	1.518	NM_014316	calcium regulated heat stable protein 1, 24kDa	2.304
NM_130469	jun dimerization protein 2	1.493	BC022779	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2	1.846
NM_031209	queuine tRNA-ribosyltransferase 1 (tRNA-guanine transglycosylase)	1.491	NM_001719	bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1)	1.817
NM_003564	transgelin 2	1.482	NM_017590	zinc finger CCH-type containing 7B	1.736
NM_021826	FAST kinase domains 5 (FASTKD5)	1.480	NM_052900	retinol binding protein 7, cellular	1.598
BT007321	general transcription factor IIB, polypeptide 4, 52kDa	1.383	NM_005724	tetraspanin 3	1.577
AF099011	EH-domain containing 1	1.382	NM_032129	pleckstrin homology domain containing, family N member 1	1.479
NM_153361	hypothetical protein MGC42105	-4.525	NM_020317	chromosome 1 open reading frame 63	-1.938
NM_009589	arylsulfatase D	-4.016	NM_005803	flotillin 1	-1.835
NM_000125	estrogen receptor 1	-3.891	NM_001967	eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 2	-1.779
NM_032726	phospholipase C, delta 4	-3.745	NM_005345	heat shock 70kDa protein 1A	-1.748
NM_006477	RAS-related on chromosome 22	-3.472	NM_015528	ring finger protein 167	-1.698
NM_004797	adiponectin, C1Q and collagen domain containing	-2.513	NM_032272	MAF1 homolog (S. cerevisiae)	-1.675
NM_015555	zinc finger protein 451	-2.506	NM_024786	zinc finger, DHHC-type containing 11	-1.667
NM_002285	AF4/FMR2 family, member 3	-2.469	NM_005275	guanine nucleotide binding protein-like 1	-1.650
NM_012410	seizure related 6 homolog (mouse)-like 2	-2.463	NM_003516	histone 2, H2aa	-1.645
NM_005242	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	-2.066	NM_001964	early growth response 1	-1.623
A549			Sa3		
Genbank	Description	Fold change	Genbank	Description	Fold change
NM_006743	RNA binding motif (RNP1, RRM) protein 3	3.046	NM_006121	keratin 1 (epidermolytic hyperkeratosis)	2.383
NM_014563	trafficking protein particle complex 2	1.964	NM_014316	calcium regulated heat stable protein 1, 24kDa	1.934
NM_014316	calcium regulated heat stable protein 1, 24kDa	1.945	NM_001946	dual specificity phosphatase 6	1.805
NM_001280	cold inducible RNA binding protein	1.825	NM_005547	involucrin	1.756
NM_000475	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1	1.805	BC006322	activating transcription factor 3	1.753
NM_145307	pleckstrin homology domain containing, family K member 1	1.788	NM_005555	keratin 6B	1.750
NM_013962	neuregulin 1	1.731	NM_003125	small proline-rich protein 1B (cornifin)	1.656
NM_182687	protein kinase, membrane associated tyrosine/threonine 1	1.725	NM_014604	Tax1 (human T-cell leukemia virus type 1) binding protein 3	1.605
NM_024680	E2F transcription factor 8	1.710	NM_003315	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 7	1.568
NM_006123	iduronate 2-sulfatase (Hunter syndrome)	1.688	NM_002964	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	1.564
NM_000508	fibrinogen alpha chain	-3.571	NM_005359	SMAD, mothers against DPP homolog 4 (Drosophila)	-1.976
NM_005039	proline-rich protein BstNI subfamily 1	-3.185	NM_001348	death-associated protein kinase 3	-1.698
NM_002113	complement factor H-related 1	-2.899	NM_130901	OTU domain containing 7	-1.695
NM_001885	crystallin, alpha B	-2.801	NM_000524	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A	-1.667
NM_001964	early growth response 1	-2.513	NM_006419	chemokine (C-X-C motif) ligand 13 (B-cell chemoattractant)	-1.667
NM_004617	transmembrane 4 L six family member 4	-2.463	NM_032805	zinc finger protein 206	-1.623
NM_006744	retinol binding protein 4, plasma	-2.410	NM_207370	G protein-coupled receptor 153	-1.618
NM_004543	nebulla	-2.353	NM_020999	neurogenin 3	-1.595
NM_000204	I factor (complement)	-2.331	NM_005205	cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 2	-1.592
NM_021870	fibrinogen gamma chain	-2.288	NM_004118	forkhead-like 18 (Drosophila)	-1.590
HSC3					
Genbank	Description	Fold change			
NM_014411	nasopharyngeal carcinoma associated gene protein-8	4.253			
NM_032972	protocadherin 11 Y-linked	4.037			
NM_005854	receptor (calcitonin) activity modifying protein 2	3.662			
NM_001485	gastrulation brain homeobox 2	3.570			
NM_015831	acetylcholinesterase (YT blood group)	3.528			
NM_032237	hypothetical protein FLJ23356	3.478			
NM_024867	KPL2 protein	3.472			
NM_004132	hyaluronan binding protein 2	3.345			
NM_002602	phosphodiesterase 6G, cGMP-specific, rod, gamma	3.205			
NM_178536	lipocalcin 12	3.186			
NM_002733	protein kinase, AMP-activated, gamma 1 non-catalytic subunit	-2.309			
NM_031266	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	-2.212			
NM_005556	keratin 7	-2.105			
NM_006753	surfeit 6	-1.996			
NM_006925	splicing factor, arginine/serine-rich 5	-1.988			
NM_022044	stromal cell-derived factor 2-like 1	-1.984			
NM_005694	COX17 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)	-1.828			
NM_018645	hairy and enhancer of split 6 (Drosophila)	-1.821			
NM_005954	metallothionein 3 (growth inhibitory factor (neurotrophic))	-1.761			
NM_001662	ADP-ribosylation factor 5	-1.754			

伝子の中には、総じて転写因子および転写調節因子が多く含まれていた。

5. 遠赤外線感受性細胞に特異的に発現する遺伝子の検索

FIR 照射による細胞増殖抑制の起因遺伝子を検索する目的で、5 種類の細胞株を、FIR 照射により有意に増殖

抑制された細胞株 (A549, HSC3 および Sa3 細胞。以下、FIR 感受性細胞株と記す) と増殖抑制されなかった細胞株 (A431 および MCF7 細胞。以下、FIR 非感受性細胞株と記す) に分け、ついでマイクロアレイ実験において FIR 感受性細胞株と FIR 非感受性細胞株との間で発現量が1.5倍以上異なり、かつ有意に発現が変動している遺伝子を抽出した。その結果、FIR 感受性細胞株において発現が促進され、FIR 非感受性細胞株では発現の変化が認められない動態を示す遺伝子として、ATF3 遺伝子が抽出された。リアルタイム RT-PCR により ATF3 mRNA 発現量を確認したところ、マイクロアレイ実験の結果と同様に、FIR 感受性細胞株では発現が促進され、FIR 非感受性細胞株では発現の変化が認められなかった (図 4)。

6. 癌細胞株における ATF3 過剰発現の影響の検討

マイクロアレイ解析により、ATF3 遺伝子の発現が FIR 照射による細胞増殖抑制に関与している可能性が

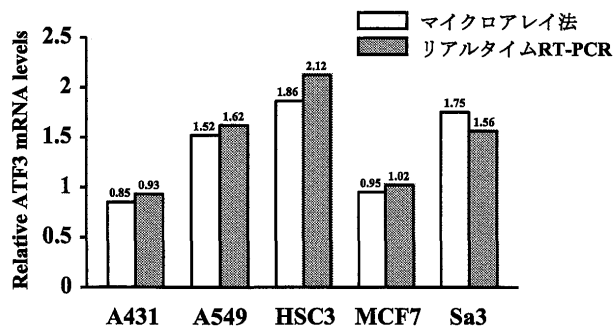


図4 リアルタイム RT-PCR 法による ATF3 mRNA の発現解析

リアルタイム RT-PCR 法により、FIR 照射4日目における ATF3 mRNA の発現量を解析した。縦軸は、(FIR 照射群の ATF3 mRNA 発現量/非照射群の ATF3 mRNA 発現量)を示す。5種類の細胞間において、マイクロアレイ解析と同様に FIR 感受性細胞株 (A549, HSC3, Sa3) において発現が促進され、FIR 非感受性細胞株 (A431, MCF7) では発現の変化が認められなかった。

示唆されたため、ATF3 過剰発現が細胞増殖に及ぼす影響を検討した。本実験には、口腔領域において発症率の高い舌癌 HSC3 細胞と歯肉癌 Sa3 細胞、さらに、同じ扁平上皮癌である A431 細胞を用いた。これら3細胞株について ATF3 過剰発現細胞 (以下、A431-ATF3 細胞、HSC3-ATF3 細胞および Sa3-ATF3 細胞と略記する) ならびに empty vector 導入細胞 (以下、A431-Neo 細胞、HSC3-Neo 細胞および Sa3-Neo 細胞と略記する) を樹立し、ATF3 mRNA および ATF3 蛋白質の発現量をリアルタイム RT-PCR と Western blot 法で確認したところ、有意な ATF3 mRNA の上昇 (図5 A A431-ATF3 細胞で1.6倍、HSC3-ATF3 細胞で16.1倍、Sa3-ATF3 細胞で8.2倍) および ATF3 蛋白質発現の上昇を認めた (図5 B)。ついで、生細胞数測定によって ATF3 過剰発現が細胞増殖に及ぼす影響について検討を行った。いずれの細胞株においても、ATF3 過剰発現は細胞増殖を抑制した (図6 A)。また、HSC3-ATF3 細胞と Sa3-ATF3 細胞では、細胞質の肥大化した細胞が認められた (図6 B)。

7. アンチセンスオリゴ法による ATF3 発現抑制法の検討

FIR 照射時に発現する ATF3 の役割を検討する目的で、有効なアンチセンス効果が得られた HSC3 細胞において、アンチセンスオリゴ法により ATF3 mRNA の発現抑制を行うとともに、発現抑制が細胞増殖に及ぼす影響を検討した。すなわち、オリゴヌクレオチド導入後の ATF3 mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR にて確認した結果、アンチセンスオリゴ導入細胞において ATF3 mRNA 発現が有意に抑制された (図7 A)。ついで、

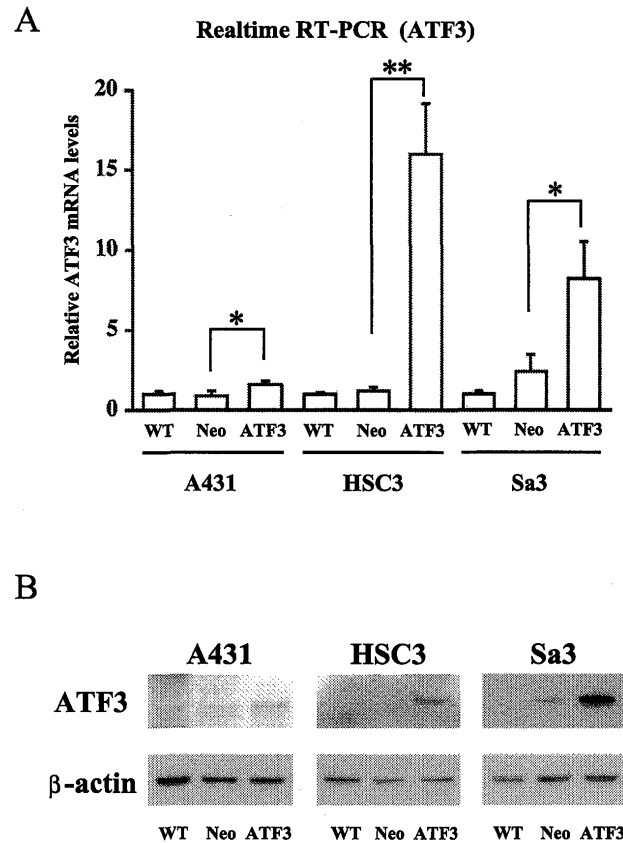


図5 ATF3 過剰発現細胞の遺伝子発現の検討

A: リアルタイム RT-PCR 法により、A431 細胞、HSC3 細胞および Sa3 細胞より樹立した ATF3 過剰発現株の ATF3 mRNA の発現量を定量的に解析した。値は ATF3 mRNA 発現量を β -actin mRNA 発現量で補正した後、WT を1.0とした発現量の相対値として示した。(n = 3, *p < 0.05, **p < 0.01) WT: コントロール群, Neo: pcDNA3.1 empty vector 導入細胞, ATF3: pcDNA3.1-ATF3 導入細胞。各 ATF3 過剰発現株において ATF3 mRNA の有意な発現上昇が認められた。

B: Western blotting 法により ATF3 蛋白質の発現を定量的に解析した。各 ATF3 過剰発現株において ATF3 蛋白質の発現が上昇していた。

ATF3 アンチセンスオリゴ導入が細胞増殖に及ぼす影響を FIR 照射群と非照射群で比較した。その結果、FIR 照射群では増殖抑制が有意に阻害されたが、非照射群では増殖能に顕著な差は認められなかった (図7 B)。

8. HSP70A 発現量と細胞増殖率の相関の検討

HSP70A 発現量と FIR 照射による細胞増殖抑制効果との間に定量的な相関関係があるのか否かを明らかにするため、マイクロアレイ実験における HSP70A 発現量 (シグナル値) と、FIR 照射による増殖抑制率 (FIR 照射群

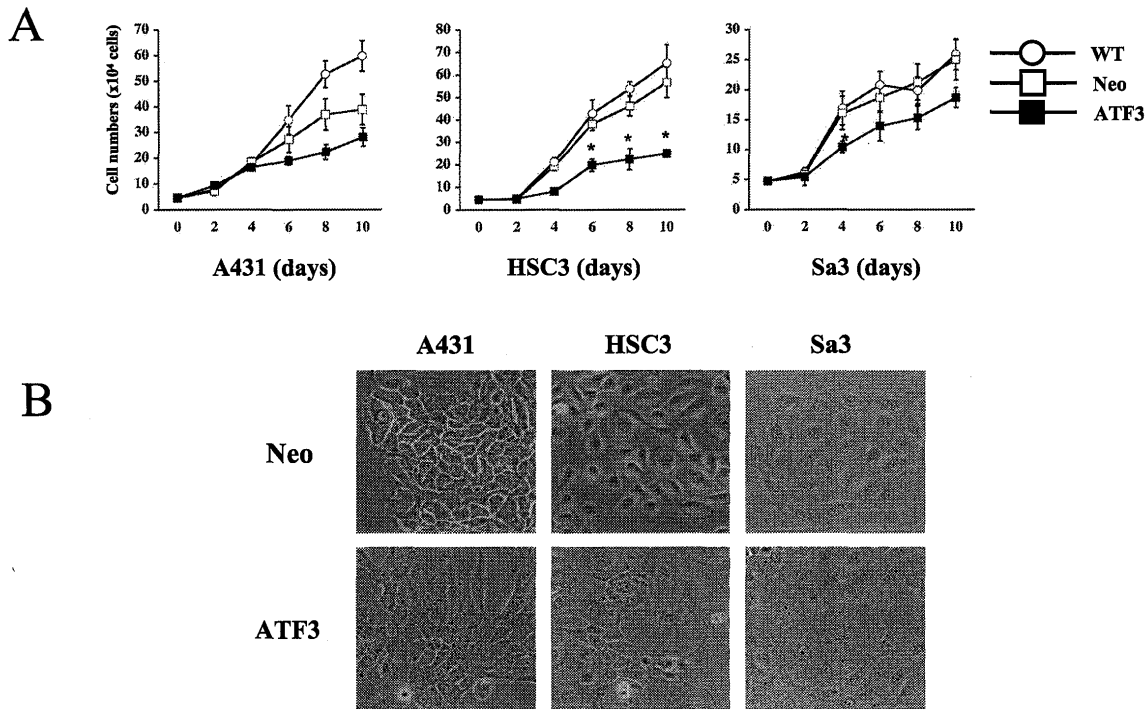


図6 ATF3 過剰発現細胞の細胞増殖能および細胞形態の検討

A : ATF3 過剰発現細胞の細胞増殖能を測定した。細胞を24穴ディッシュに 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。(n = 4, * : empty vector 導入細胞に対して $p < 0.05$) 各値は平均値 \pm 標準偏差を示す。ATF3 の過剰発現は3細胞すべてにおいて増殖抑制傾向を示した。

B : ATF3 過剰発現細胞の細胞形態を観察した。上段は pcDNA3.1 の empty vector 導入細胞, 下段に ATF3 過剰発現細胞の細胞形態を示した。(バー : 20 μ m) HSC3 および Sa3 細胞の ATF3 過剰発現株において細胞質の肥大化像が認められた。一方, A431 細胞の ATF3 の過剰発現株では顕著な形態変化は観察されなかった。

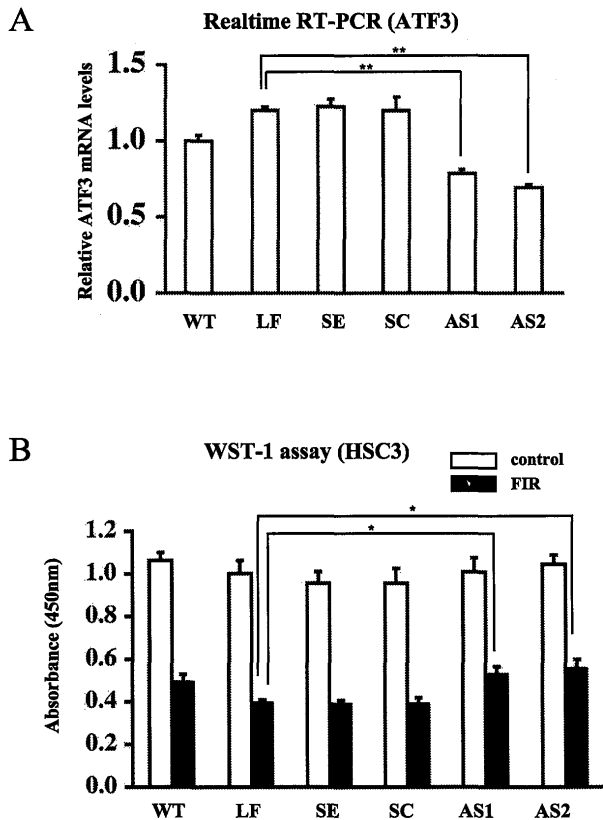


図7 アンチセンスオリゴ法による ATF3 発現抑制の細胞増殖への影響

A : HSC3 細胞における, ATF3 アンチセンスオリゴ法による発現抑制細胞のリアルタイム PCR 法による発現量の確認。値は ATF3 mRNA 発現量を β -actin mRNA 発現量で補正した後, WT を1.0とした発現量の相対値で示した。(n = 3, ** $p < 0.01$) WT : コントロール群 LF : Lipofectamine2000のみ投与, SE : センスオリゴ導入群, SC : スクランブルオリゴ導入群, AS1 : アンチセンスオリゴ導入群 (ATF3 mRNA の5'末端より30塩基まで), AS2 : アンチセンスオリゴ導入群 (ATF3 mRNA の120塩基より150塩基まで)

B : Aと同様の条件のもと, HSC3 細胞を FIR 照射群と非照射群に分け, WST-1法による細胞増殖能試験を行った。(n = 6, * $p < 0.05$) ATF3 アンチセンスオリゴ導入細胞は, 非照射群において, 増殖能を有意に変化させなかった。FIR 照射群では, 細胞増殖能はすべての条件下において, 非照射群に比べ低下していた。また, ATF3 アンチセンスオリゴ導入細胞では, Lipofectamine2000のみ投与群に比べ, 細胞増殖能の低下が有意に阻害されていた。

の細胞数/コントロール群の細胞数)との相関関係を検討した。増殖抑制率には、FIR 感受性細胞株と非感受性細胞株の差が顕著に始まる照射6日目のデータ(図1A)を用いた。その結果、非照射群0.837(図8A)、FIR 照射群0.821(図8B)と、ともに同様の高い相関率を有していた。さらに、HSP70以外のHSPファミリーについても、増殖抑制率との相関関係を検討した。今回用いたマイクロアレイに搭載されている35のHSPファミリー(重複含む)について、同様に相関係数を求めた結果、HSP70Aはその中でも高い相関係数を有していた(表4、HSP70AはHSPA1Aと示されている)。なお、FIR 照射4日目の場合には、十分な増殖抑制が現れていないことから、いずれの細胞においても相関を認めるには至らなかった。また、HSP70A mRNAの経時的発現量の変化を検討した結果、MCF7細胞の8日目を除いて、5種類の細胞株間で、非照射群とFIR群の間に有意差は認められなかった(図9)。

考 察

1. 癌細胞の由来組織による遠赤外線感受性の違い

生体に対するFIRの効果については、その温熱作用に着目した*in vivo*における報告がその多くを占め^{5,6,11,12,19-22}、常温域での*in vitro*における報告は、遠赤外線が細胞周期遅延と細胞壊死により細胞増殖を抑制させ、その効果には内在性HSP70が影響したとする細川の報告¹⁶と、FIRの線源として竹炭を培養ディッシュの下に敷き、HeLa細胞の増殖抑制を確認したとする報告¹⁾をみるのみである。我々は、これまで常温FIRの生物学的作用に着目し、37°Cで高い照射効率を有するFIR放射物質の開発、それを線源とした細胞培養装置や動物飼育装置の開発、さらにそれらの装置を用いて、ヒト癌細胞株A431、HSC3およびSa3細胞の*in vivo*と*in vitro*における研究を行ってきた¹⁴⁻¹⁶。これらの研究によると、*in vitro*においてFIRで増殖抑制が認められたのは、舌癌由来細胞株HSC3細胞と歯肉癌由来細胞株Sa3細胞の、ともに口腔由来の扁平上皮癌であった。そこで本研究では、非口腔組織由来の癌細胞株に対するFIR照射の影響についても検討を行った。その結果、FIRは非口腔癌である肺腺癌由来のA549細胞においては増殖を抑制し、乳癌由来のMCF7細胞に対しては抑制効果の認められないことが明らかとなった。FIRの線源が異なるものの、ヒト子宮頸部由来であるHeLa細胞で増殖が抑制された報告¹⁾と併せると、FIRによる癌細胞株の*in vitro*での増殖抑制効果は非口腔癌に対しても生じ得ることが示唆された。

2. マイクロアレイ解析から明らかになった遠赤外線の作用

本研究では、網羅的な遺伝子発現解析ツールであるマイクロアレイ法を用い、FIRが遺伝子発現に及ぼす影

響について検討を行った。その結果、発現が有意に変動した遺伝子には転写因子や転写調節因子が多く含まれ、FIRが発現調節の段階に強く作用していることが示唆された。さらに、FIRによる増殖抑制と相関して発現が変化する特定の遺伝子を検索したところ、FIR感受性細胞株に共通して発現するATF3遺伝子が抽出された。ATF3はATF/CREB転写因子ファミリーに属する22kDの転写因子で^{23,24}、非刺激下ではほとんど発現しないが、増殖因子、サイトカイン、ionizing radiation (IR)、UV、酸化ストレス、小胞体ストレス、非ステロイド性消炎鎮痛剤、インターフェロン、虚血、創傷などを含む様々な刺激に反応して発現する事が報告されている²⁵⁻²⁹。環境の様々な刺激に対し、細胞死、細胞庇護あるいは細胞増殖という異なった応答を行っており、“adaptive response (適応応答)”蛋白質であると考えられている³⁰。ATF3はJNK(c-Jun N-terminal kinase)/SAPK(stress-activated protein kinase) pathwayや³⁰二本鎖RNA依存性プロテインキナーゼ(PKR)からのシグナルを受けるほか³¹、刺激によって異なる様々なシグナル経路に含まれる事が明らかになってきており、これらのシグナルは、総じてATF3による転写を促進するよりも、むしろ抑制的に働く。例えば、*in vivo*ではmatrix metalloproteinase-2(MMP2)の転写を阻害してラット腫瘍の増殖・浸潤を抑制すること³²や、interleukin(IL)-6、IL-12の転写を抑制すること³³が報告されている。今回のマイクロアレイ結果からは、前記のシグナル経路や転写に関連する遺伝子、すなわちATF2、c-Jun、p53、early growth response 1(EGR-1)、MMP2、IL-6、IL-12の発現に有意な変化は認められなかった。

FIR照射実験およびATF3過剰発現実験において、ATF3発現上昇に伴い細胞増殖抑制が認められた。ATF3発現が細胞増殖を抑制する機構については、ATF3過剰発現がG₁/S期において細胞周期を遅延させるとのHeLa細胞での報告³²があるが、FIR照射で細胞増殖抑制が認められた細胞のうち、HSC3細胞ではG₂/M期で細胞周期を遅延させるが、Sa3細胞では変化しないとの報告¹⁶があり、FIR照射によるATF3発現時の増殖抑制の作用機構については今後も検討が必要と考えられる。

また、ATF3はアポトーシスに誘導的^{18,31}もしくは抑制的^{29,34}に働くことが報告されている。これらの相反する結果は刺激の種類に起因すると考えられているが、今回、FIR照射によりATF3発現が促進された細胞株において、アポトーシス細胞数に有意な変動は認められなかった。さらに、個々の細胞形態が最も顕著に観察できる培養4日目のFIR照射実験およびATF3過剰発現実験での形態学的観察では、ATF3の発現に伴い、細胞質・核の肥大化が認められた。細胞質の肥大化についてはネクロシスとの関連が考えられるが、FIR照射で細胞増殖抑制が認められた細胞のうち、Sa3細胞では、ネクロシス細胞数がわずかに増加するが、HSC3細胞では

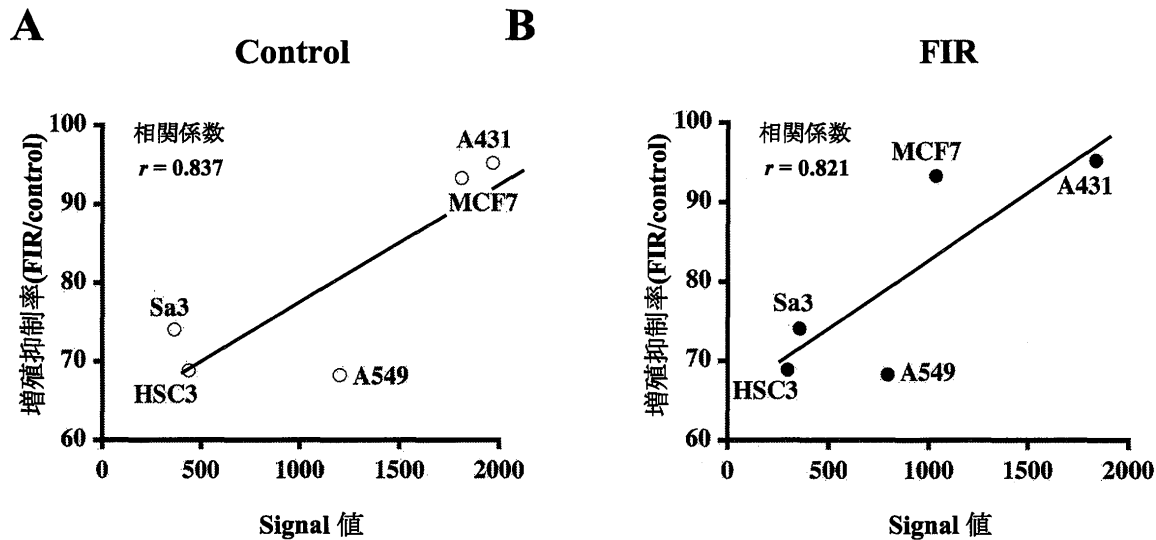


図8 HSP70発現量と細胞増殖率の相関の検討

A: マイクロアレイ法における非照射群の HSP70 発現量 (シグナル値) と, FIR 照射6日目における増殖抑制率との相関関係を検討した。増殖抑制率は図1の結果より算出し, 相関はピアソンの相関係数を用いた。非照射群の HSP70 発現量 (シグナル値) と増殖抑制率との間に0.837という高い相関係数が認められた。

B: マイクロアレイ法における FIR 照射群の HSP70 発現量と FIR 照射6日目における増殖抑制率との相関関係を検討した。FIR 照射群においても同様に0.821の高い相関係数が認められた。

表4 cDNA マイクロアレイ法における HSP family の発現量と細胞増殖率との相関の検討

図4の方法に基づき, 本実験で用いたマイクロアレイに搭載されていた35種の HSP ファミリーの発現量と, 細胞増殖率の相関を算出した。そのうち, 相関の高いものから順に10遺伝子を示す。HSP70 mRNA 発現量が細胞増殖率との間に高い相関を示した。

遺伝子名	相関係数
heat shock protein 75 (TRAP1)	0.888
heat shock 70kD protein 12B (HSPA12B)	0.875
heat shock 90kDa protein 1, alpha (HSPCA)	0.861
heat shock 70kDa protein 1A (HSPA1A)	0.837
heat shock 70kDa protein 1-like (HSPA1L)	0.762
heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin) (HSPD1)	0.755
heat shock 90kDa protein 1, beta (HSPCB)	0.720
heat shock 27kDa protein 1 (HSPB1)	0.706
heat shock protein (hsp110 family) (APG-1)	0.545
heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin10) (HSPE1)	0.539

増減しないとの報告¹⁶⁾があり, ネクロシスとの関連を結論づけることはできない。今後, 他の細胞株も含めた, FIR 照射による ATF3 発現時の細胞質・核の肥大化に関して, さらなる検討が必要である。また, ATF3 の発現に伴う細胞質・核の肥大化は FIR 照射刺激に特異的な現象と考えられ, その他の刺激ではこのような現象は報告されていない。なお, A431 細胞に ATF3 を過剰発現させた A431-ATF3 細胞では細胞増殖の抑制が認め

られたものの, 細胞質の肥大化が認められなかったことは, ATF3 の過剰発現量が他の細胞株に比べて低かったことに起因していることは否めず, 今後の検討課題と考えられる。

以上のことから, FIR 照射によって ATF3 誘導シグナル経路の関連遺伝子の発現に変動が認められないこと, FIR 照射による ATF3 発現はアポトーシスに関与せず,むしろ細胞質の肥大化をきたすことより, FIR 照射によ

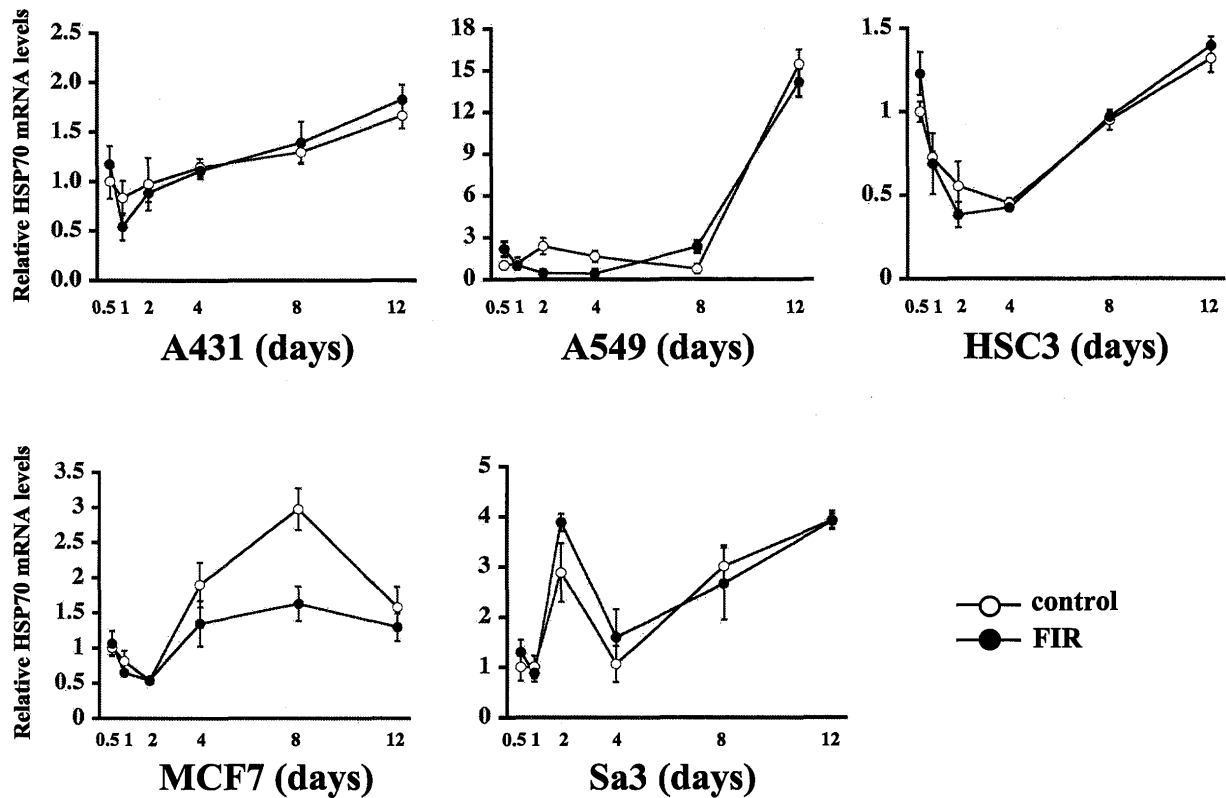


図9 遠赤外線照射がHSP70 mRNA発現量に及ぼす影響

5種類の癌細胞株におけるHSP70 mRNAの経時的発現量の変化を検討した。値はHSP70 mRNA発現量を β -actin mRNA発現量で補正した後、非照射群の12時間での値を1.0として発現量の相対値で示した。MCF7細胞の8日目を除いて、5種類の細胞間で、非照射群とFIR群の間に有意差は認められなかった。(n=3, p<0.05)

るATF3発現は、IRやUVによる致命的な細胞障害作用のもの²⁵⁻²⁹⁾とは異なるシグナル経路を經由することで、細胞の増殖を抑制し、細胞質・核の肥大化を引き起こしていると考えられる。

3. 遠赤外線に対するHSP70Aの保護効果

先に、細川は舌癌由来細胞株HSC3細胞、歯肉癌由来細胞株Sa3細胞および外陰部癌由来細胞株A431細胞の各扁平上皮癌細胞について、内在性のHSP70の発現量が多いとFIRによる増殖抑制が阻害されることを報告した¹⁶⁾。HSPファミリーは分子量ごとにHSP10, SP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP110に分類されているが³⁵⁾、HSP70は癌細胞に高発現し、分子シャペロンとして致死的高熱、内毒素、UV、NO、心筋虚血などの様々なストレスから細胞を保護していることが報告されており³⁶⁻³⁹⁾、HSP70がFIRによる増殖抑制作用からも細胞を保護していることが考えられた。本実験では、さらに肺腺癌由来細胞株A549細胞と乳癌由来細胞株MCF7細胞を加え、由来組織が異なる癌細胞株におけるHSPファミリーの内在性発現量とFIRの増殖抑制効果

との間の定量的な相関関係の有無を中心に、HSPによるFIR効果の調節機構について検討を行った。その結果、HSP70の内在性mRNA発現量が、FIRによる増殖抑制率と高い相関を有することが明らかとなった。また、細川の研究では、内在性HSP70の発現量の高かったA431細胞においても、HSP70蛋白質をノックダウンさせると、FIR照射に伴って増殖が抑制されることが報告されており、我々はin vitroにおいて、FIR照射は癌細胞株の細胞増殖を抑制する方向に働くと考えている。FIR照射が増殖を抑制するか否かは内在性HSP70の発現量に依存すると考えられるが、その目安の閾値が存在せず、その判断は漠然としたものであった。今回、マイクロアレイ実験のFIR非照射群におけるシグナル値1,500がおおよその閾値となる(図8)という結果が得られた。今後、FIR照射を臨床治療に応用する際に、癌細胞の内在性HSP70の発現量を予め測定することで、FIRの治療効果を予測することができることを示唆している。

また、本研究では、5種類の癌細胞株において、FIR照射が照射12日目までHSP70 mRNAの発現量を変化させないことが明らかになった(図9)。さらに、マイク

ロアレイの解析結果のうち、照射4日目において有意に発現が促進されたHSPファミリーはなく、その他の代表的な熱刺激反応遺伝子である transient receptor potential vanilloid receptor (TRPV)⁴⁰⁾ の発現にも変化は認められなかった(表3)。これらの実験結果は、常温FIRが熱ショックを誘導するストレスではないこと、すなわち、本研究における常温FIRは、従来の熱ショックを誘導するFIRの温熱効果とは異なる働きで作用していることが示唆された。

4. 遠赤外線におけるエネルギーの伝達

吸血コウモリ、ボア科ヘビ、マムシ等には、他者の発するFIRに対する受容器が存在することが知られている⁴¹⁾。これに対し、ヒトやラットでは、FIRの生理的作用が多く報告されているにも関わらず、FIR受容体の存在は知られておらず、FIRが直接細胞に作用していることが示唆されている。

FIRが直接細胞に作用するメカニズムとして、FIRによる水分子の共鳴が考えられる。FIRに対する水分子の固有振動数は 3656 cm^{-1} 、 3756 cm^{-1} 、 1594 cm^{-1} で、それぞれ水の基準振動である対称伸縮振動、非対称伸縮振動、変角振動に対する振動数である⁴²⁾。対称伸縮振動は酸素両側のO-H結合が同時に伸びたり縮んだりする際の振動であり、非対称伸縮振動は一方が伸びた時、他方が縮む際の振動であり、変角振動は、酸素を中心に2つの結合水素が互いに反発したり、引き合ったりする結果、H-O-Hの結合角が約104度を基準に開閉する際の振動である。FIR放射に対する水の共鳴波長は各振動数の逆数で、それぞれ 2.74 、 2.66 、 $6.27\text{ }\mu\text{m}$ である。また、水分子が固体もしくは液体のとき、複数の水分子が水素結合することで瞬間的なクラスターが形成され⁴³⁾、総合作用の結果、水分子には多種多様の振動パターンが現れる。さらに、水分子の運動の速度や向きも多様なため、実際の共鳴波長は、上記波長の基準振動の周りにある程度の幅を持つことになる。さらに、入射したFIRは、水分子が作る電磁振動場の中で減速されたり、方向を変えられたり、加速されたりして、水分子の層厚が $10\text{ }\mu\text{m}$ を越えると、 $3\text{ }\mu\text{m}$ 以上のFIRは全て吸収され、波長依存性がなくなってしまう。これらを考慮すると、照射されたFIRのうち、水分子の固有振動数に共鳴する波長のFIRは特異的に吸収されて分子運動に転換され、それ以外の波長のFIRも、分子間の振動などを増幅するために吸収されるか、あるいは分子同士の衝突などにより消失していく。その際に、吸収されたエネルギーの一部は水分子の伸縮や変角運動に変わり、残りは電磁波の再放射に用いられ、隣接する水分子の共鳴吸収に変わる。このような様式で、水分子の固有振動数に共鳴する波長のFIRのエネルギーは、分子運動に変換されながら、共鳴現象により伝達されていく。それ以外の波長のFIRは、非特異的な運動や衝突により容易に運動エネルギーに変

換され、深部に浸透することなく消失するものと考えられる。

以上のような機構で、強い特異的波長を有するエネルギーが水分子を介して細胞膜に到達すると考えられる。細胞膜では、膜内に存在する蛋白質、糖質および脂質の共鳴波長は多少幅を持って変化するとしても、メチレン基の共鳴波長は $3.43\text{ }\mu\text{m}$ 、 $3.51\text{ }\mu\text{m}$ 、 $13.9\text{ }\mu\text{m}$ であり、C-H変角は $7.28\text{ }\mu\text{m}$ 、 $6.90\text{ }\mu\text{m}$ の周辺波長であるため、細胞膜に到達したエネルギーが膜内物質の分子振動に特異的に変換されている可能性は高い。膜内物質の中でも特に感受性の高い(共鳴波長を持つ)物質に構造変化をもたらすことによって、情報が細胞深部に伝達され、ATF3の発現を介して、本研究で認められた増殖抑制、細胞質・核の肥大化等の表現形の変化につながったと考えられる。さらにこのことは、培養細胞に特異的ではなく、水分が体重の約60%を占める生体においても、常温域のFIR照射が水分子の共鳴エネルギーの伝達を介して、深部に存在する種々の細胞に作用するものと推測できる。また、血液やリンパ液などの水分濃度の高い細胞成分には、FIRが強く作用するものと考えられる。

今回用いたcDNAマイクロアレイはmRNA発現のみの変化をとらえる解析法であるため、分子振動による酵素の活性化や、蛋白質への翻訳調節、種々のシグナル伝達経路でのリン酸化の変化などについては把握できない。今後はATF3およびHSP70と関連する物質の動態について、さらなる検討が必要と考えられる。

結 論

本研究において遠赤外線照射がヒト癌細胞株に及ぼす効果について検討し、以下の結果を得た。

1. 非口腔由来癌である肺癌細胞株A549細胞でも増殖が抑制され、形態変化が認められたことから、遠赤外線癌細胞増殖抑制効果は、口腔組織由来の癌細胞に特異的な作用ではないと考えられた。
2. FIR反応性の細胞に特異的に発現する遺伝子を検索した結果、ストレス反応性の転写因子ATF3が抽出された。ATF3の過剰発現実験により、細胞増殖が抑制され、細胞質の肥大化が認められた。また、HSC3細胞におけるATF3の発現抑制実験により、FIRによる細胞増殖抑制作用の阻害が認められた。
3. 5種類の癌細胞株のマイクロアレイ解析より、HSP70の発現量はFIRによる増殖抑制率と強く相関しており、35種のHSPファミリーの中でも高い相関を示すことがはじめて明らかとなった。さらに、FIRによりHSP70 mRNAの発現量は変化しなかった。

以上のことから、常温域におけるFIR照射は、*in vitro*において、由来組織に関わらずストレス反応蛋白質であるATF3の発現を介し、ヒト癌細胞株A549、HSC3およびSa3細胞の増殖を抑制することが示唆された。さらに、

内在性 HSP70 蛋白質が FIR の増殖抑制作用を阻害することから、FIR に対しては ATF3 と HSP70 の2つの調節機構が働いていることが考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究課題を与えられご指導、ご高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 口腔顎顔面形態学分野 北村清一郎教授に深甚なる謝意を表しますとともに、懇切なるご高閲、御助言をいただきました口腔顎顔面外科学分野 長山 勝教授、分子薬理学分野 吉本勝彦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顔面形態学分野 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ご協力いただいた口腔顎顔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) Teraoka F, Hamada Y and Takahashi J: Bamboo charcoal inhibits growth of HeLa cells in vitro. *Dent Mater J* 23, 633-637 (2004)
- 2) Silverstein R, Basseler G and Morrill T: 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, 90-132.
- 3) Gress TM, Muller-Pillasch F, Weber C, Lerch MM, Friess H, Buchler M, Beger HG and Adler G: Differential expression of heat shock proteins in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 54, 547-551 (1994)
- 4) 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)
- 5) Udagawa Y and Nagasawa H: Effects of combined treatment with coffee cherry and whole-body hyperthermia on the growth of spontaneous mammary tumours in SHN mice. *In Vivo* 14, 431-435 (2000)
- 6) Udagawa Y, Nagasawa H and Kiyokawa S: Inhibition by whole-body hyperthermia with far-infrared rays of the growth of spontaneous mammary tumours in mice. *Anticancer Res* 19, 4125-4130 (1999)
- 7) Yu S-Y, Chiu J-H, Yang S-D, Hsu Y-C, Lui W-Y and Wu C-W: Biological effect of far-infrared therapy on increasing skin microcirculation in rats. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 22, 78-86 (2006)
- 8) 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, 426-446.
- 9) 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)
- 10) Inoue S and Kabaya M: Biological activities caused by far-infrared radiation. *Int J Biometeorol* 33, 145-150 (1989)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) Yamashita K, Hosokawa H, Ishibashi J, Ishikawa N, Morimoto H, Ishikawa T, Nagayama M and Kitamura S: Development of CO₂ incubator with limited far-infrared radiation for activation of glucose metabolism. *ITE Letters* 6, 53-57 (2005)
- 15) Hosokawa H, Yamashita K, Ishibashi J, Ishikawa N, Morimoto H, Ishikawa T, Kitamura S and Nagayama M: A new animal raiser: effect of limited infrared radiation on tumor growth of A431 cells. *ITE Letters* 6, 597-602 (2005)
- 16) 細川浩良: 特性遠赤外線照射による癌細胞の動態に関する研究. *四国歯誌* 19, 35-54 (2006)
- 17) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275 (1951)
- 18) Zhang C, Kawauchi J, Adachi MT, Hashimoto Y, Oshiro S, Aso T and Kitajima S: Activation of JNK and transcriptional repressor ATF3/LRF1 through the IRE1/TRAF2 pathway is implicated in human vascular endothelial cell death by homocysteine. *Biochem Biophys Res Commun* 289, 718-724 (2001)
- 19) Masuda A, Kihara T, Fukudome T, Shinsato T, Minagoe S and Tei C: The effects of repeated thermal therapy for two patients with chronic fatigue syndrome. *J Psychosom Res* 58, 383-387 (2005)
- 20) Ikeda Y, Biro S, Kamogawa Y, Yoshifuku S, Eto H, Orihara K, Yu B, Kihara T, Miyata M, Hamasaki S, Otsuji Y, Minagoe S and Tei C: Repeated sauna therapy increases arterial endothelial nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in cardiomyopathic hamsters. *Circ J* 69, 722-729 (2005)
- 21) Ikeda Y, Biro S, Kamogawa Y, Yoshifuku S, Eto H, Orihara K, Kihara T and Tei C: Repeated thermal therapy upregulates arterial endothelial nitric oxide synthase expression in Syrian golden hamsters. *Jpn Circ J* 65,

- 434-438 (2001)
- 22) 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)
- 23) Hai T and Curran T: Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 3720-3724 (1991)
- 24) Hai TW, Liu F, Coukos WJ and Green MR: Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers. *Genes Dev* 3, 2083-2090 (1989)
- 25) Hai T and Hartman MG: The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* 273, 1-11 (2001)
- 26) Hai T, Wolfgang CD, Marsee DK, Allen AE and Sivaprasad U: ATF3 and stress responses. *Gene Expr* 7, 321-335 (1999)
- 27) Bottone FG, Jr., Moon Y, Kim JS, Alston-Mills B, Ishibashi M and Eling TE: The anti-invasive activity of cyclooxygenase inhibitors is regulated by the transcription factor ATF3 (activating transcription factor 3). *Mol Cancer Ther* 4, 693-703 (2005)
- 28) Cai Y, Zhang C, Nawa T, Aso T, Tanaka M, Oshiro S, Ichijo H and Kitajima S: Homocysteine-responsive ATF3 gene expression in human vascular endothelial cells: activation of c-Jun NH2-terminal kinase and promoter response element. *Blood* 96, 2140-2148 (2000)
- 29) Tamura K, Hua B, Adachi S, Guney I, Kawauchi J, Morioka M, Tamamori-Adachi M, Tanaka Y, Nakabeppu Y, Sunamori M, Sedivy JM and Kitajima S: Stress response gene ATF3 is a target of c-myc in serum-induced cell proliferation. *EMBO J* 24, 2590-2601 (2005)
- 30) Lu D, Chen J and Hai T: The regulation of ATF3 gene expression by mitogen-activated protein kinases. *Biochem J* 401, 559-567 (2007)
- 31) Guerra S, Lopez-Fernandez LA, Garcia MA, Zaballos A and Esteban M: Human gene profiling in response to the active protein kinase, interferon-induced serine/threonine protein kinase (PKR), in infected cells. Involvement of the transcription factor ATF-3 IN PKR-induced apoptosis. *J Biol Chem* 281, 18734-18745 (2006)
- 32) Fan F, Jin S, Amundson SA, Tong T, Fan W, Zhao H, Zhu X, Mazzacurati L, Li X, Petrik KL, Fornace AJ, Jr., Rajasekaran B and Zhan Q: ATF3 induction following DNA damage is regulated by distinct signaling pathways and over-expression of ATF3 protein suppresses cells growth. *Oncogene* 21, 7488-7496 (2002)
- 33) Gilchrist M, Thorsson V, Li B, Rust AG, Korb M, Kennedy K, Hai T, Bolouri H and Aderem A: Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4. *Nature* 441, 173-178 (2006)
- 34) Yan C, Lu D, Hai T and Boyd DD: Activating transcription factor 3, a stress repressor, activates p53 by blocking its ubiquitination. *EMBO J* 24, 2425-2435 (2005)
- 35) Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB and Ciocca DR: Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci* 31, 164-172 (2006)
- 36) Zhao ZG and 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)
- 37) 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)
- 38) 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)
- 39) Ciocca DR and Calderwood SK: Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 10, 86-103 (2005)
- 40) Ramsey IS, Delling M and Clapham DE: An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68, 619-647 (2006)
- 41) Campbell AL, Naik RR, Sowards L and Stone MO: Biological infrared imaging and sensing. *Micron* 33, 211-225 (2002)
- 42) 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, 37-50.
- 43) Kazmann W and Eisenberg D: 水の構造と性質, 初版, 東京, みすず書房, 1988.