655nm Laserの照射がHaCaT細胞の遺伝子発現に及ぼす影響の検証

機能生理化学研究室

背景・目的

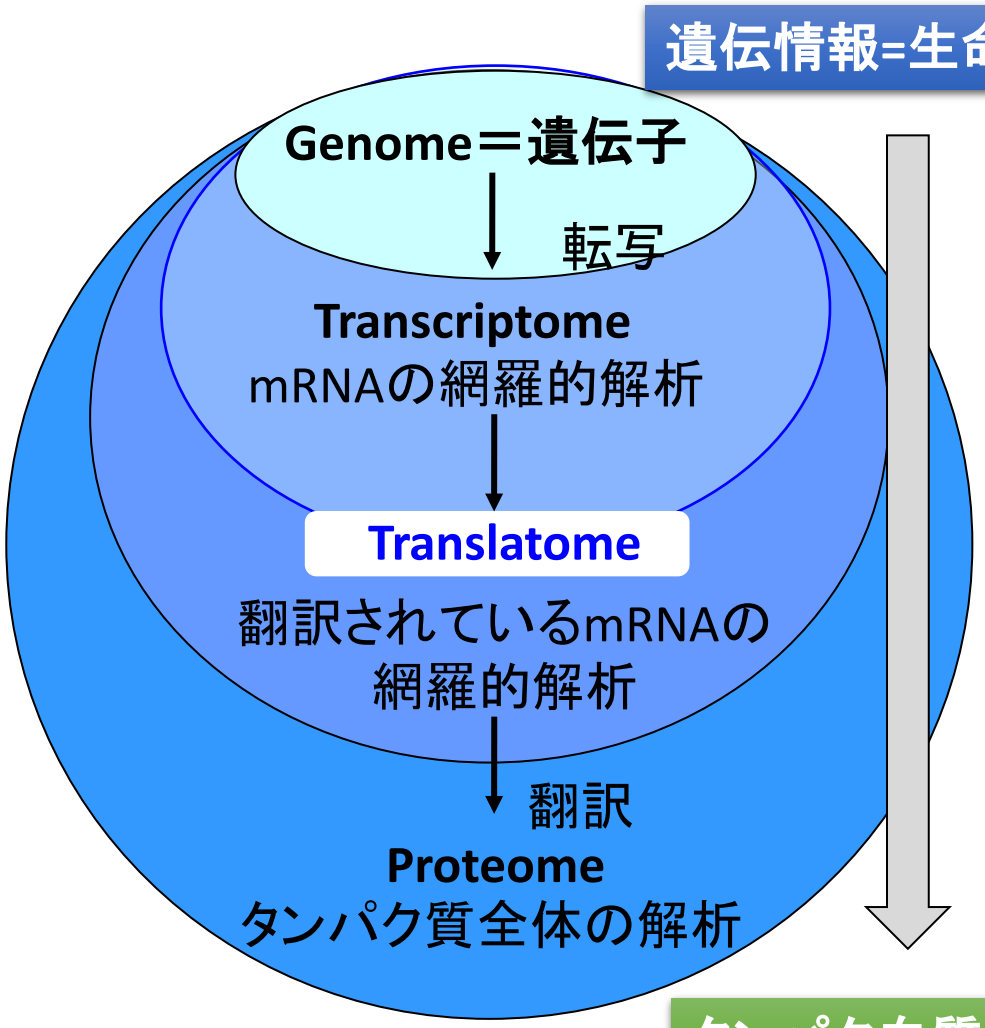
レーザー健康機器
″WizLaser®″が照射する
レーザー光が、培養細胞中
の遺伝子発現へ及ぼす影
響を網羅的に解析すること
により、生物作用を評価する。

レーザー健康機器″WizLaser®″

PSCマーク適合製品　弱レーザー時計です。　https://c-onetec.com

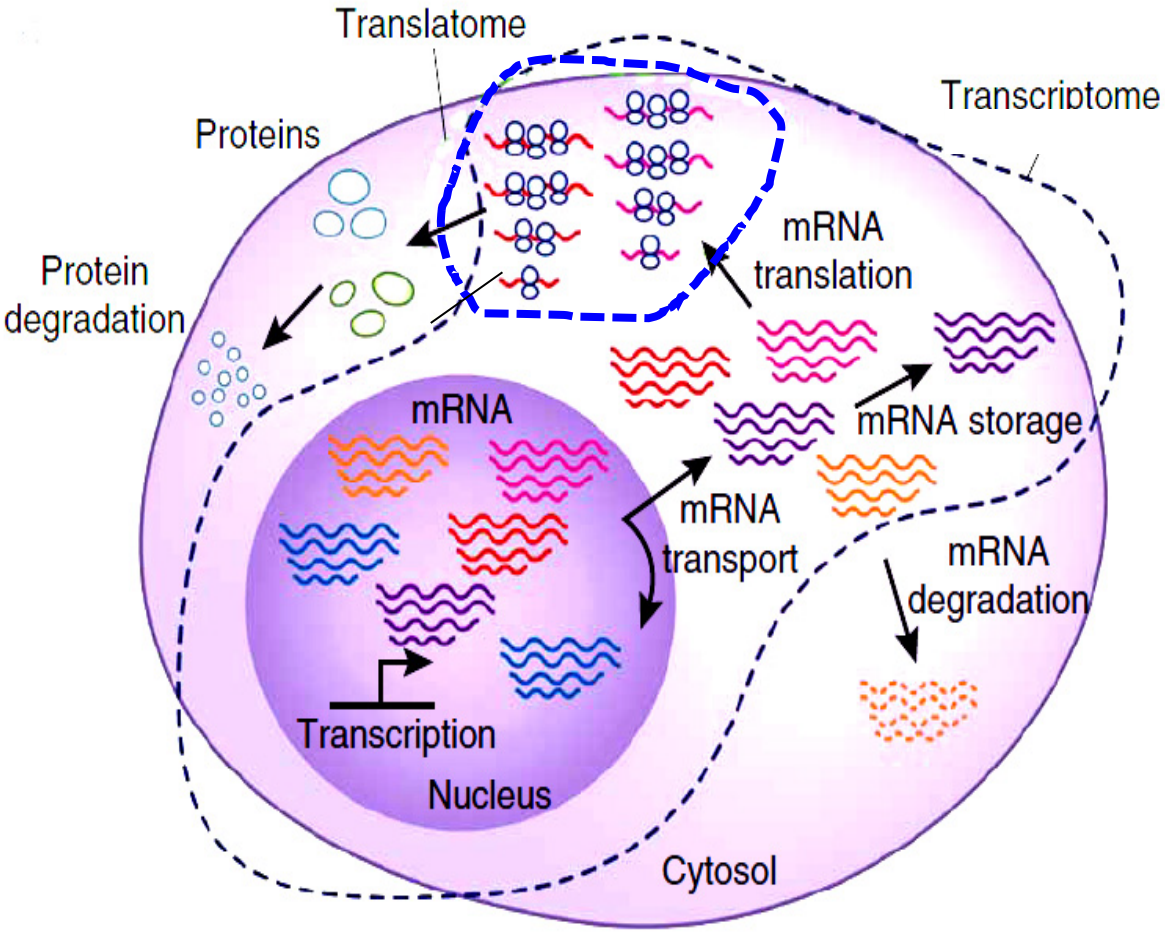
遺伝子解析におけるTranscriptomeとTranslatomeの違いについて

タンパク質の遺伝子発現を網羅的に解析することで、例えば、健常かあるいは疾病をかけているか生物の状態＝代謝を類推することが可能です。



その中で、Translatomeの変化を解析することで、生体や細胞の代謝がどの方向へ向かおうとしているか、類推することが可能となります。
平たく言えば、健康なのか、病気なのか、あるいはそれが快方に向かっているのか、悪化しているのか判断できます。
別の言い方をすれば、数万種類のバイオマーカーの情報が得られ、それから類推できます。

Translatomeでは、翻訳中のmRNAを網羅的に解析することで、代謝の状態とその変化の方向を予測することが可能となる。



網羅的解析に翻訳中のmRNAsを調製する方法

翻訳は細胞質中とミクロソームの膜上のポリソームで行われるので、そこから翻訳中、タンパク質合成の場であるリボソームが3つ以上結合したmRNAを分離・抽出する。

Transcriptome：

細胞内のmRNA全体なので翻訳されていないmRNAも含まれる

方法1

HaCaT cells、レーザー照射
0分,30分,60分

↓

Cell lysis

↓

crude nuclear fraction / lysate (supernatant)

↓

① sucrose density gradient

↓

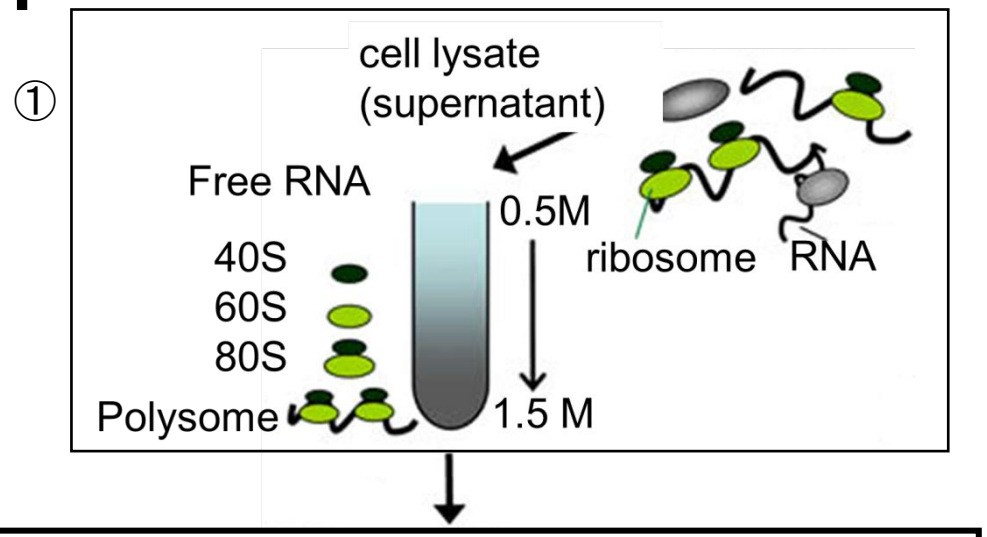
②collect polysome fraction
(RNAs with >3 bound ribosomes)

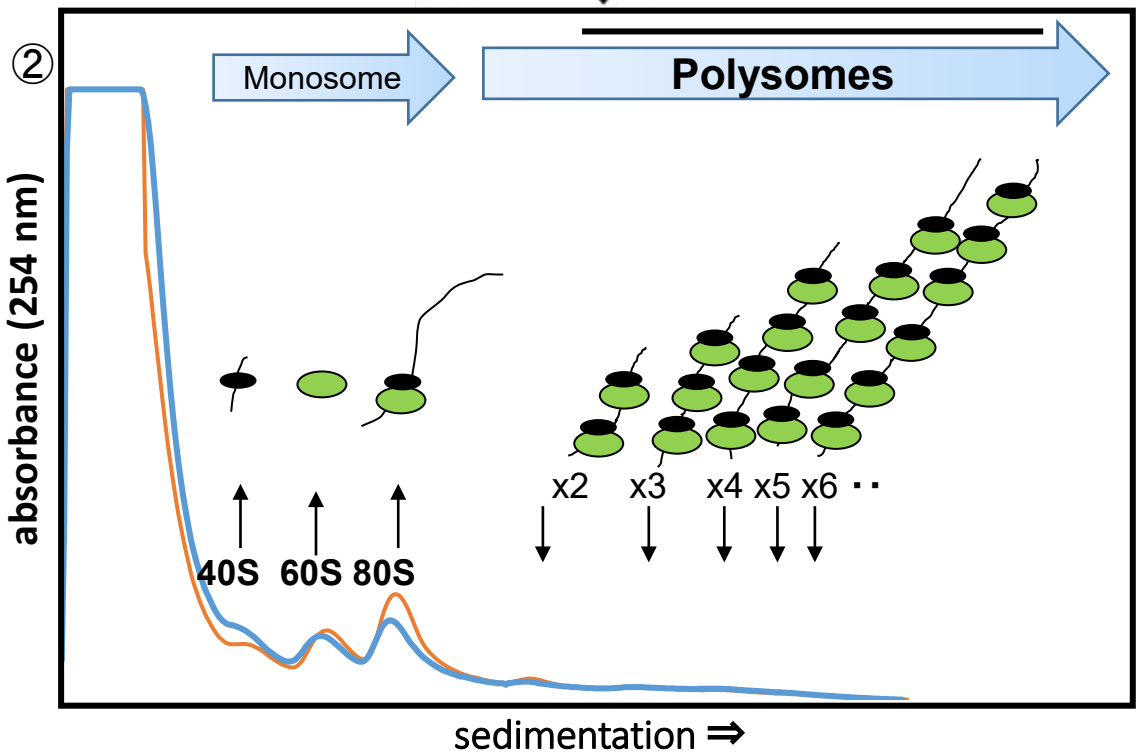
↓

RNA extraction

↓

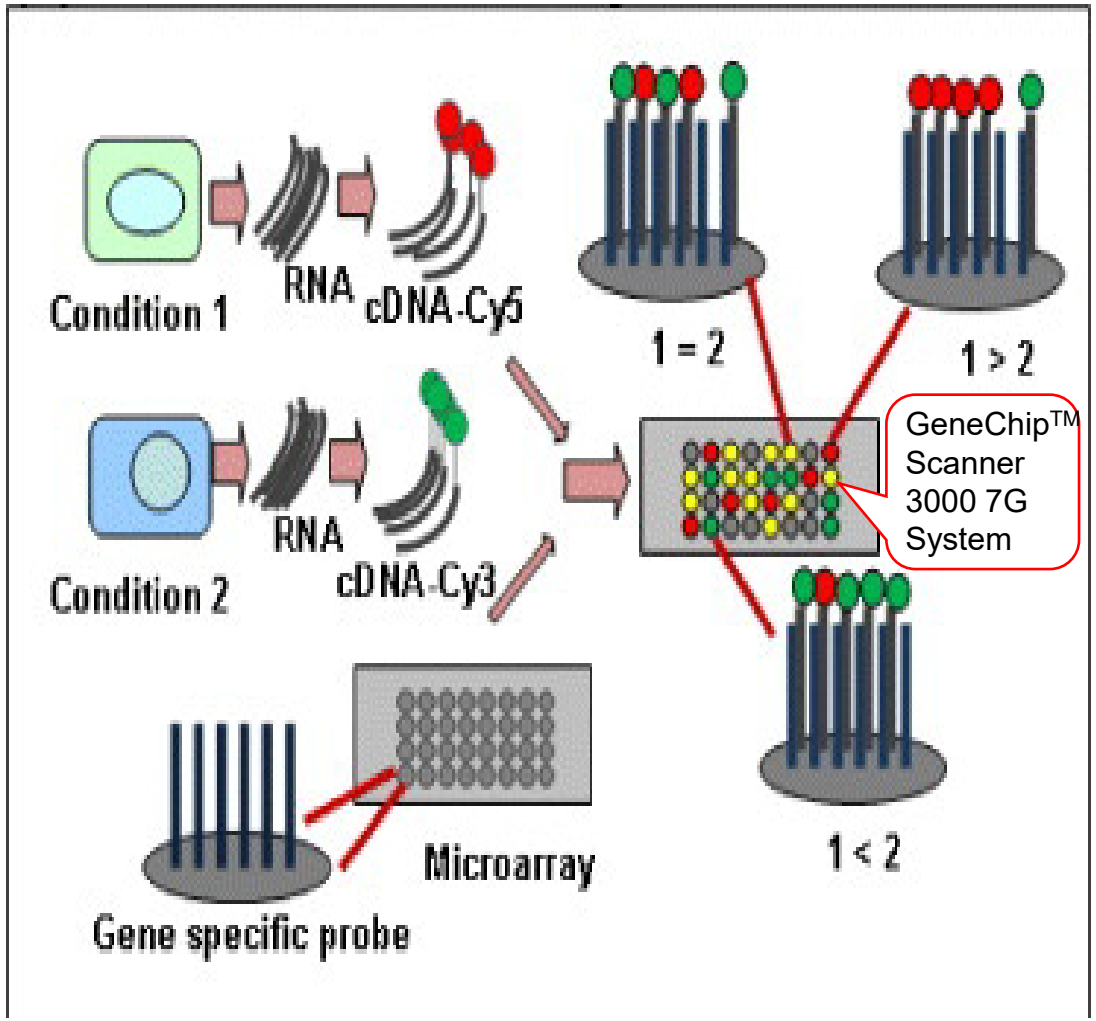
DNA マイクロアレイ解析





方法1

DNAマイクロアレイ解析

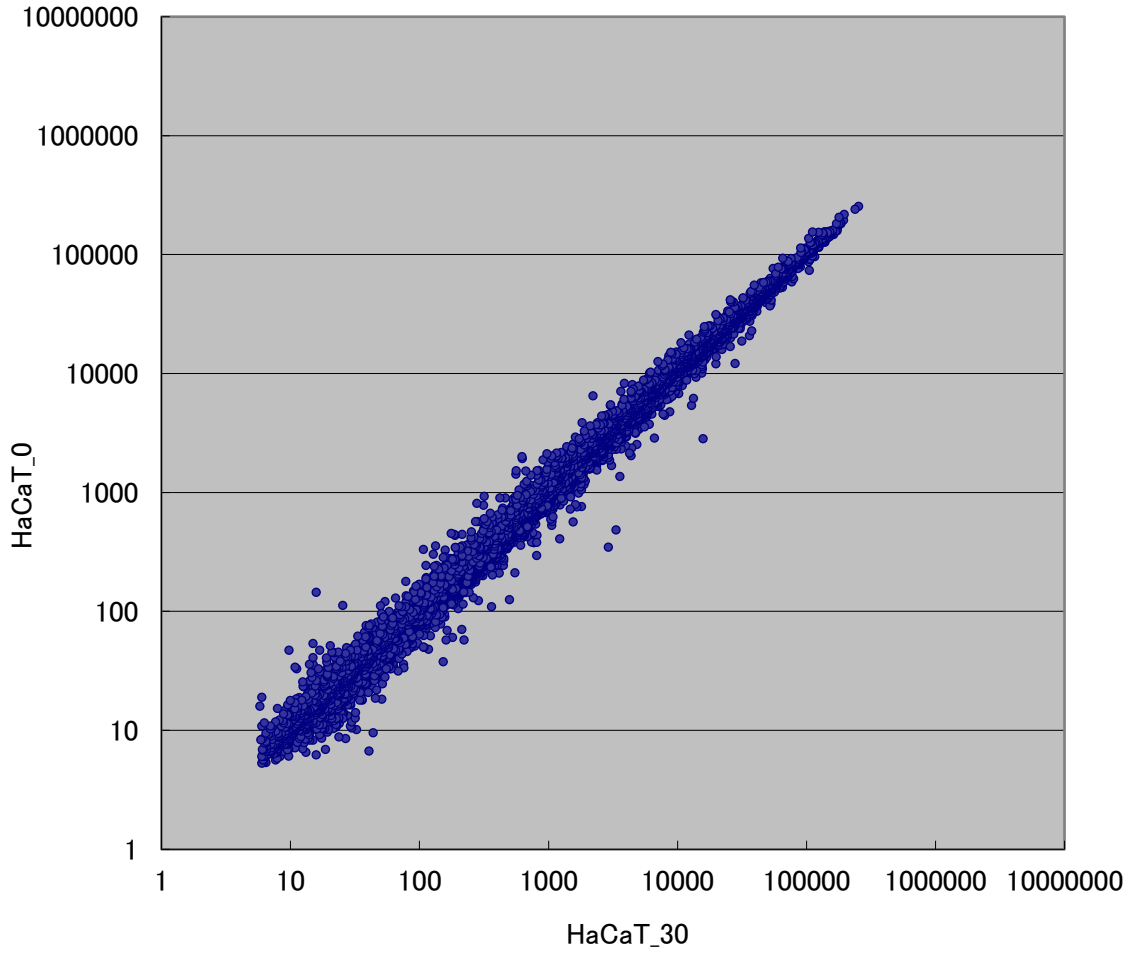


ClariomTM D Assay	Transcriptome Analysis Console (TAC) ソフトウェア
non-coding RNAや**選択的スプライシング**によるスプライシングバリアント検出	コーディング RNA とノンコーディング RNA 間の相互作用探索
lncRNAの解析	複雑な選択的スプライシング事象の解釈
バイオマーカー探索に最適なツール	バリデーション実験を設計するためのシーケンス情報の取得

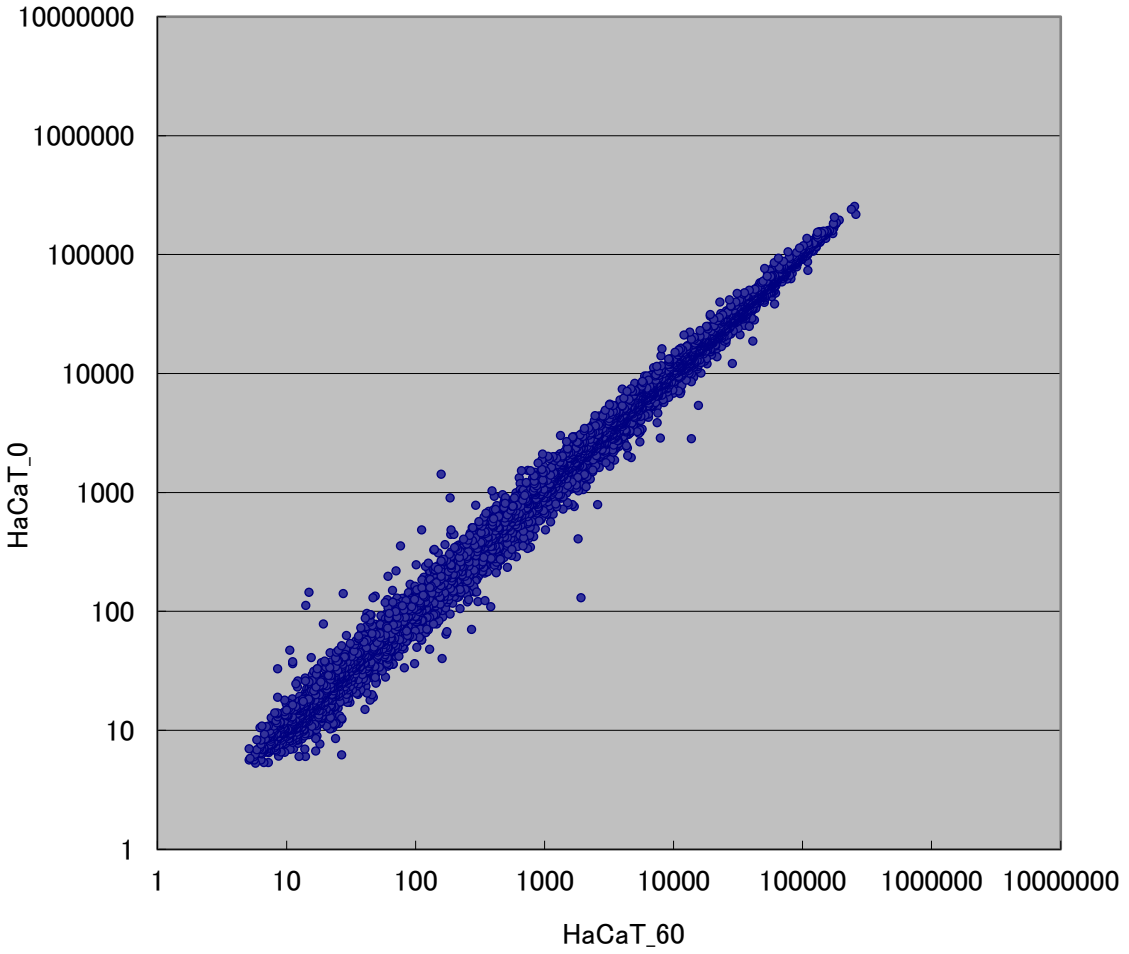
Hanagata N, Takemura T, Minowa T: Global gene expression analysis for evaluation and design of biomaterials, Sci Technol Adv Mater. 2010 Feb 22;11(1):013001. eCollection 2010 Feb, PMID: 27877315 より引用

Scatter plots of translatome with vs without laser irradiation

0 min vs 30 min

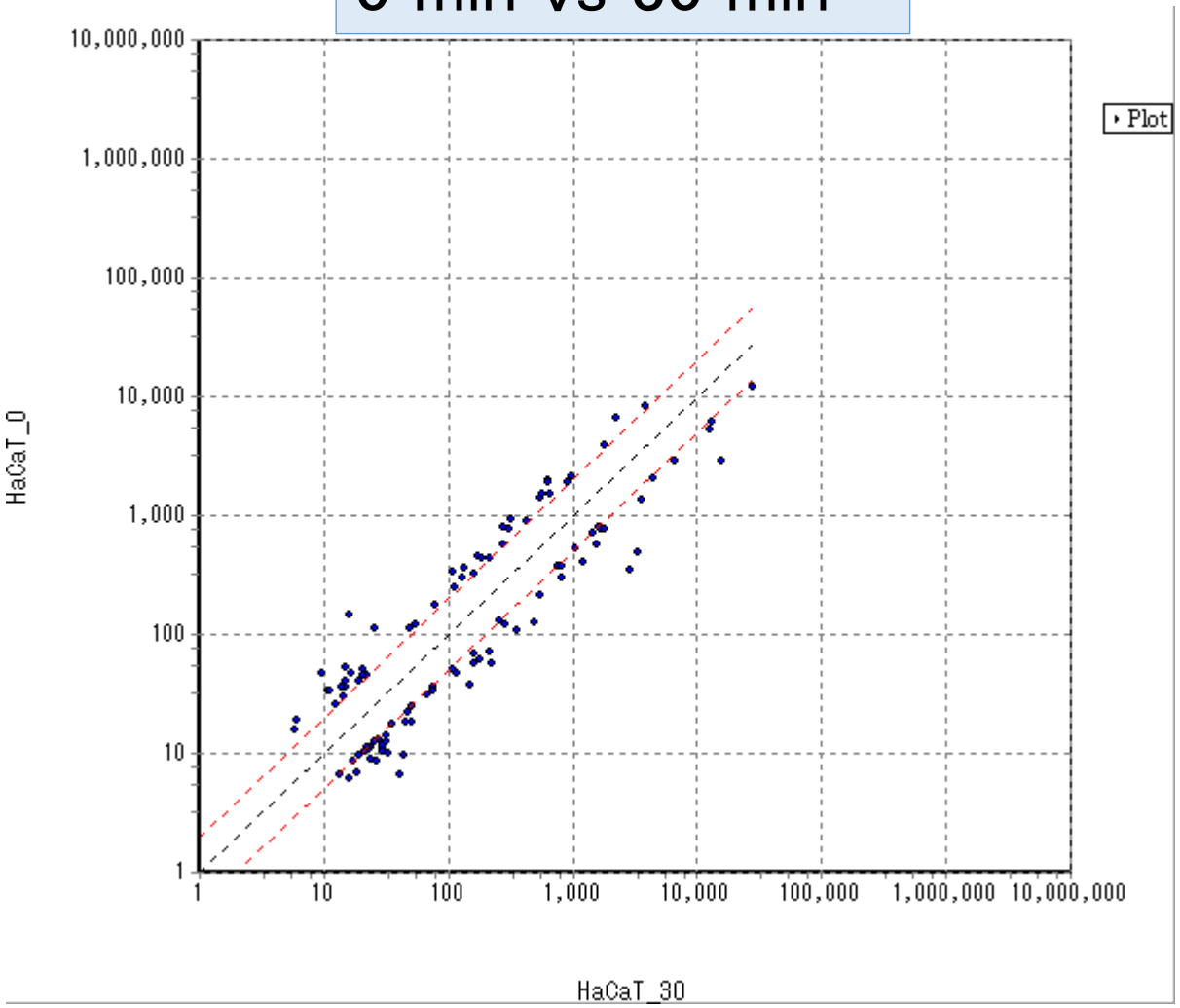


0 min vs 60 min

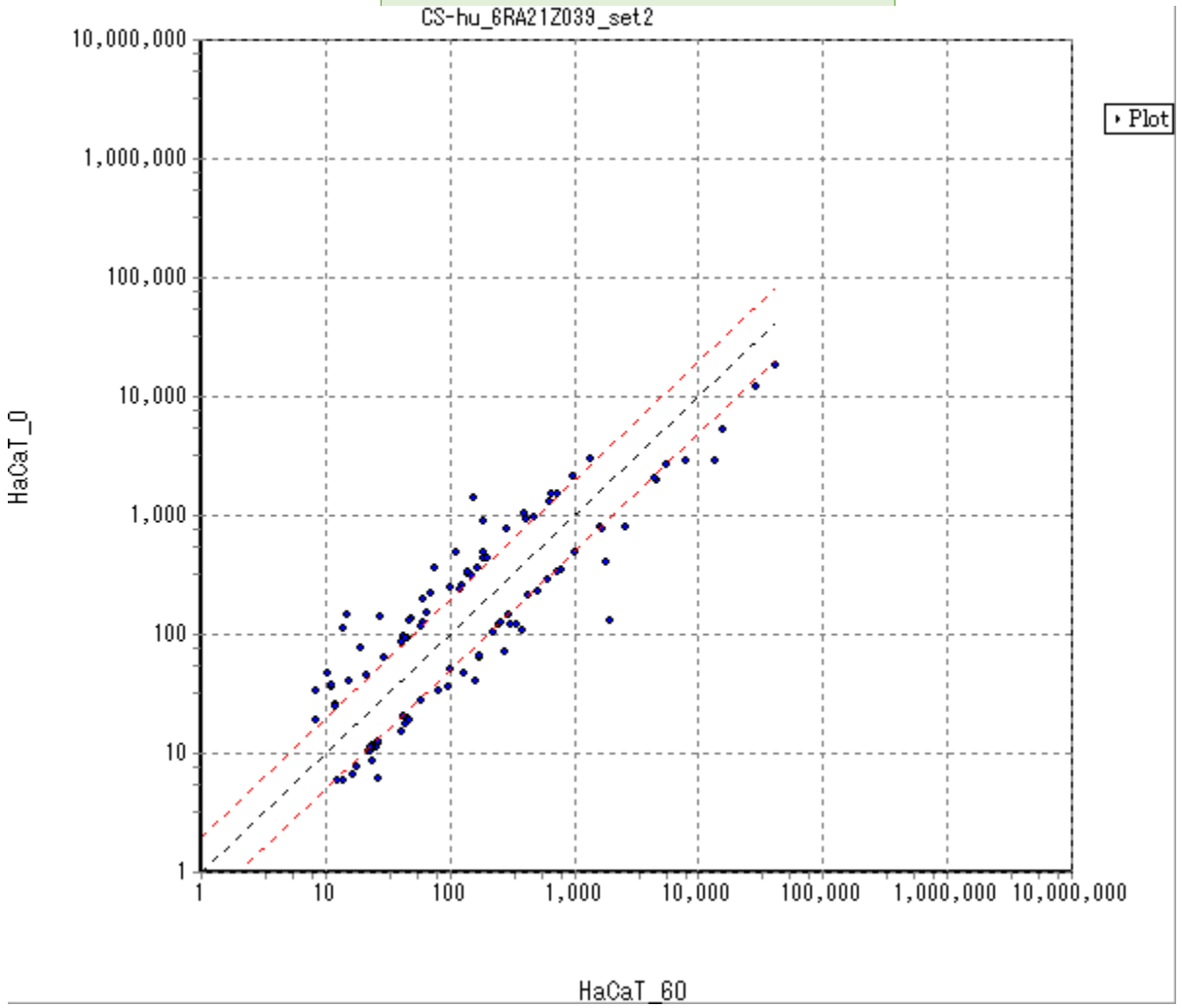


Scatter plots of translatome with vs without laser irradiation up or down regulated genes

0 min vs 30 min



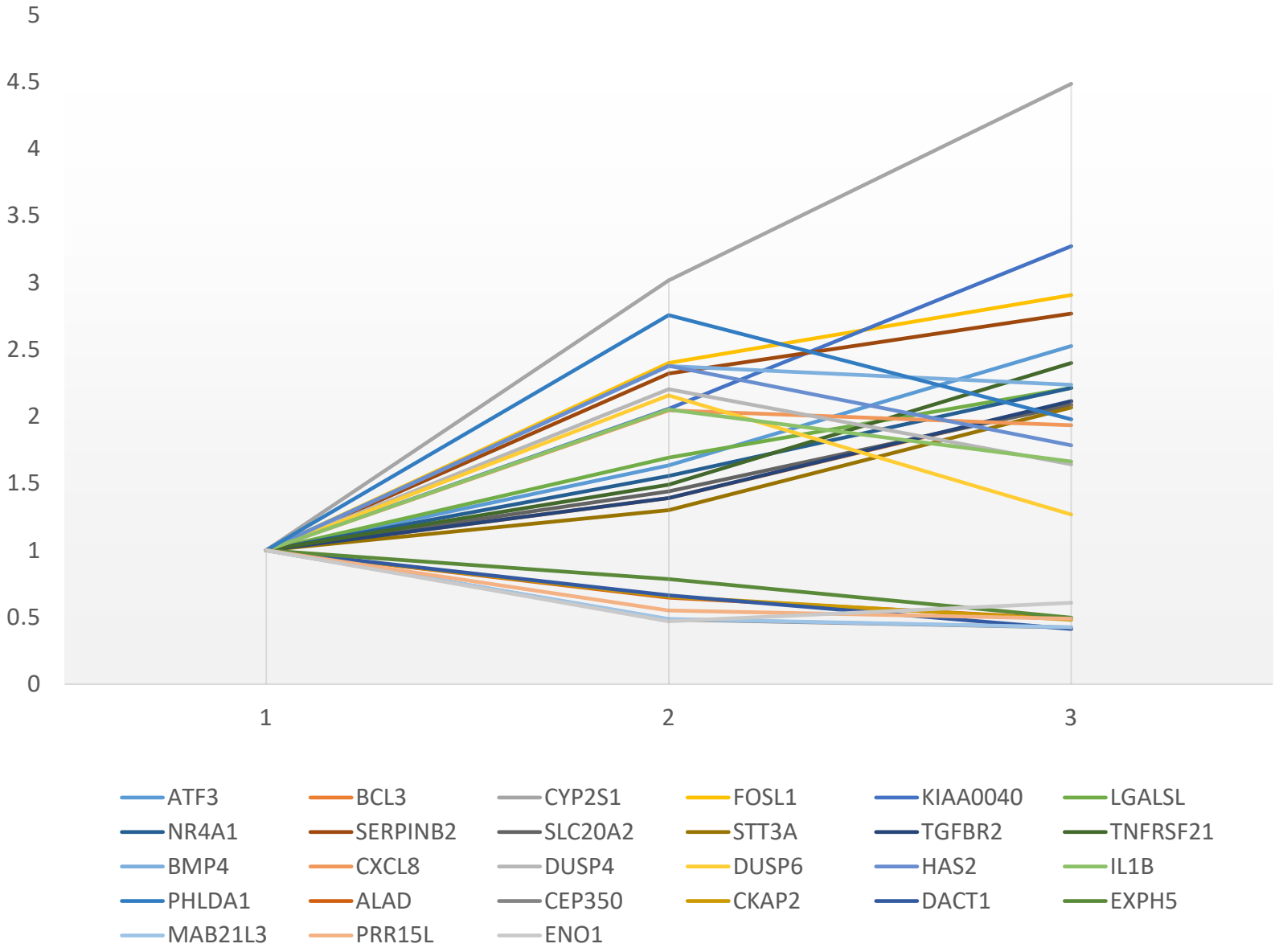
0 min vs 60 min



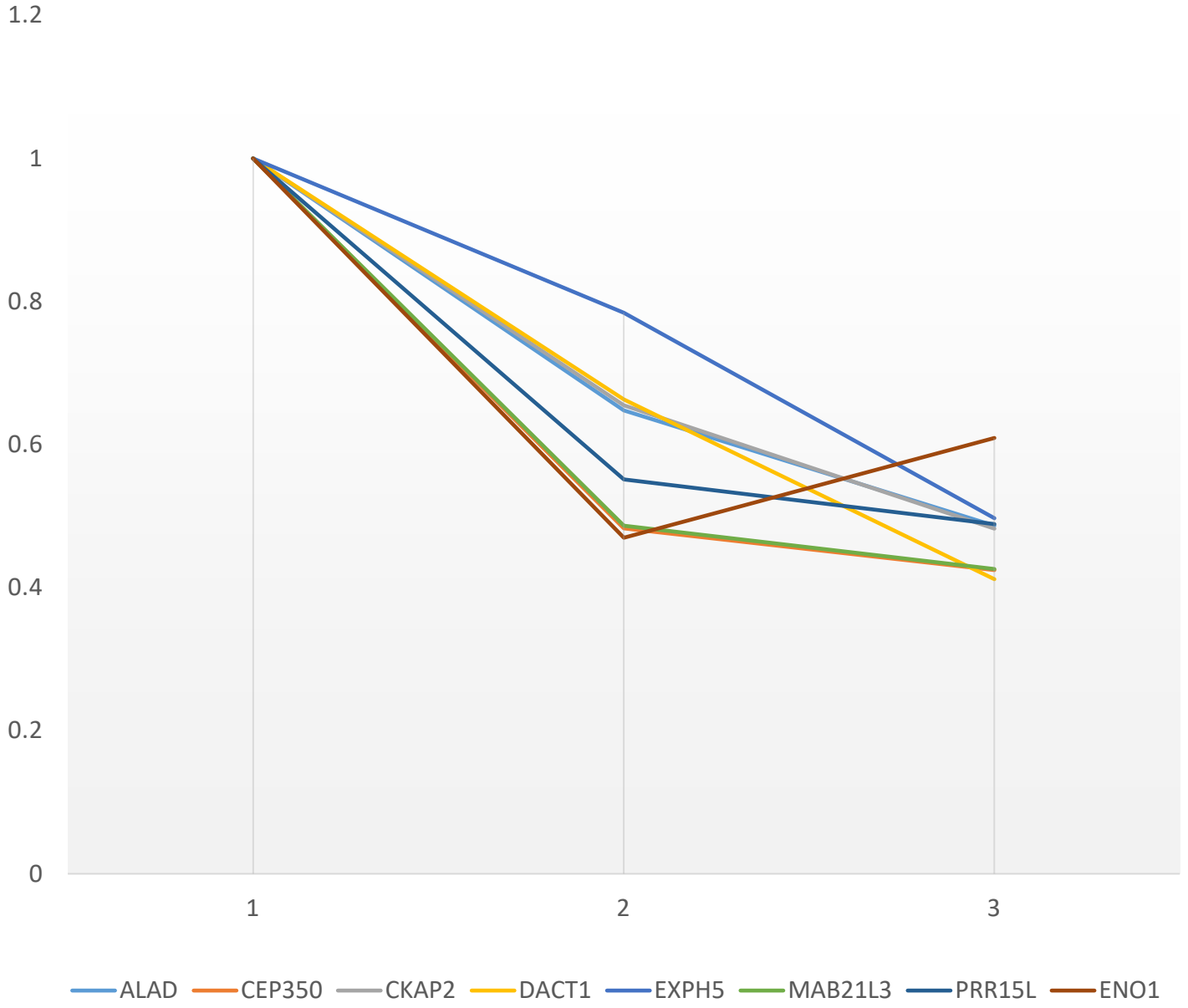
Ratio flag	Gene Accession	Gene Symbol	Gene Description	Chromosome
2Up	NM_030622	CYP2S1	cytochrome P450, family 2, subfamily S, polypeptide 1	chr19
2Up	NM_007350	PHLDA1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	chr12
2Up	NM_001300844	FOSL1	FOS-like antigen 1	chr11
2Up	NM_005328	HAS2	hyaluronan synthase 2	chr8
2Up	NM_001202	BMP4	bone morphogenetic protein 4	chr14
2Up	NM_001143818	SERPINB2	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	chr18
2Up	NM_001394	DUSP4	dual specificity phosphatase 4	chr8
2Up	NM_001946	DUSP6	dual specificity phosphatase 6	chr12
2Up	NM_001162893	KIAA0040	KIAA0040	chr1
2Up	NM_000576	IL1B	interleukin 1 beta	chr2
2Up	NM_000584	CXCL8	chemokine (C-X-C motif) ligand 8	chr4
2Down	NM_152367	MAB21L3	mab-21-like 3 (C. elegans)	chr1
2Down	NM_014810	CEP350	centrosomal protein 350kDa	chr1
2Down	hsa_circ_0000013	ENO1	Memczak2013 ANTISENSE, coding, INTERNAL, UTR3 best transcript NM_001428	chr1

Ratio flag	Gene Accession	Gene Symbol	Gene Description	Chromosome
2Up	NM_001030287	ATF3	activating transcription factor 3	chr1
2Up	NM_005178	BCL3	B-cell CLL/lymphoma 3	chr19
2Up	NM_001202	BMP4	bone morphogenetic protein 4	chr14
2Up	NM_030622	CYP2S1	cytochrome P450, family 2, subfamily S, polypeptide 1	chr19
2Up	NM_001300844	FOSL1	FOS-like antigen 1	chr11
2Up	NM_001162893	KIAA0040	KIAA0040	chr1
2Up	NM_014181	LGALSL	lectin, galactoside-binding-like	chr2
2Up	NM_001202233	NR4A1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	chr12
2Up	NM_001143818	SERPINB2	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	chr18
2Up	NM_001257180	SLC20A2	solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 2	chr8
2Up	NM_001278503	STT3A	STT3A, subunit of the oligosaccharyltransferase complex (catalytic)	chr11
2Up	NM_001024847	TGFBR2	transforming growth factor beta receptor II	chr3
2Up	NM_014452	TNFRSF21	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	chr6
2Down	NM_000031	ALAD	aminolevulinate dehydratase	chr9
2Down	NM_014810	CEP350	centrosomal protein 350kDa	chr1
2Down	NM_001098525	CKAP2	cytoskeleton associated protein 2	chr13
2Down	NM_001079520	DACT1	dishevelled-binding antagonist of beta-catenin 1	chr14
2Down	NM_001308019	EXPH5	exophilin 5	chr11
2Down	NM_152367	MAB21L3	mab-21-like 3 (C. elegans)	chr1
2Down	NM_024320	PRR15L	proline rich 15-like	chr17

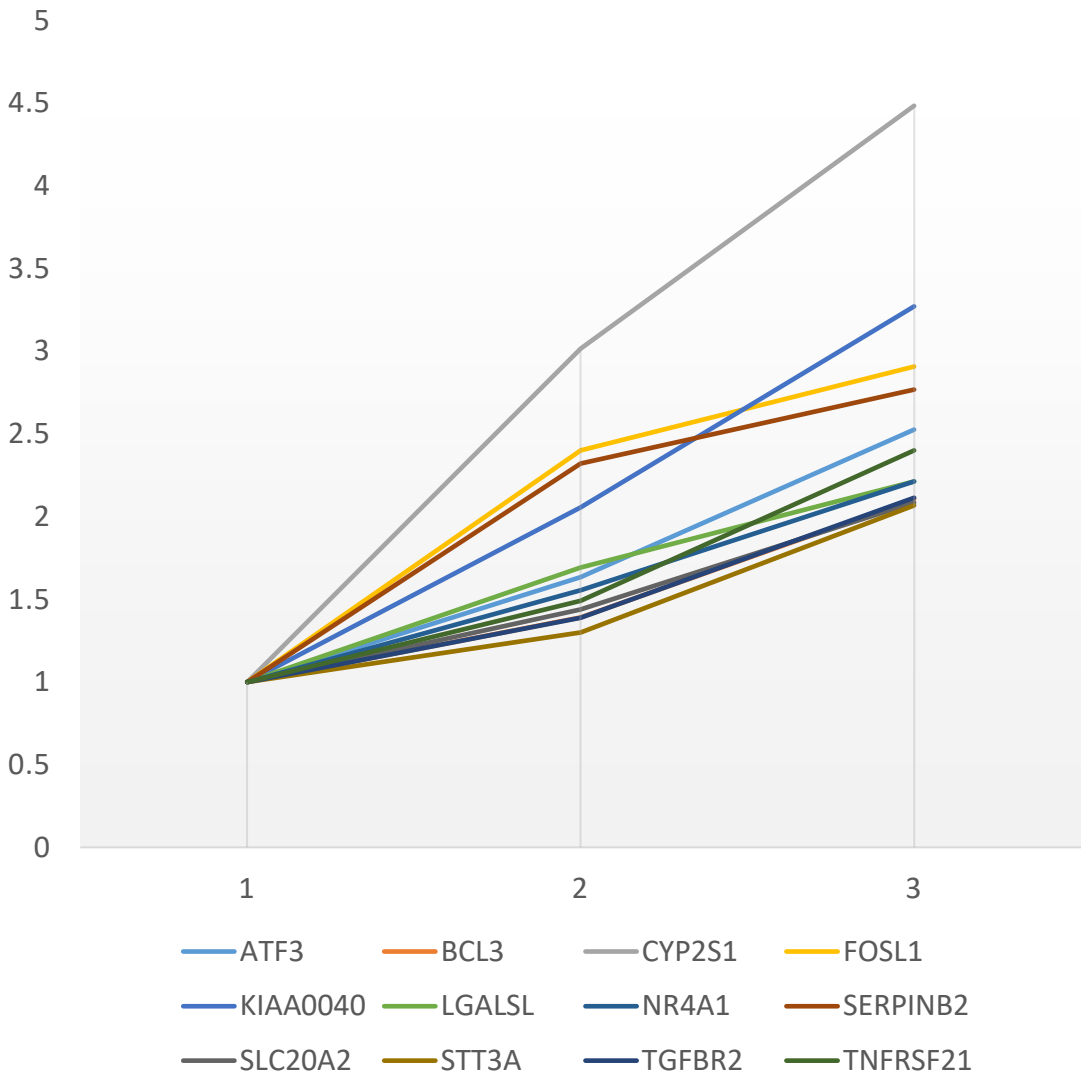
Up & Down Regulated Genes



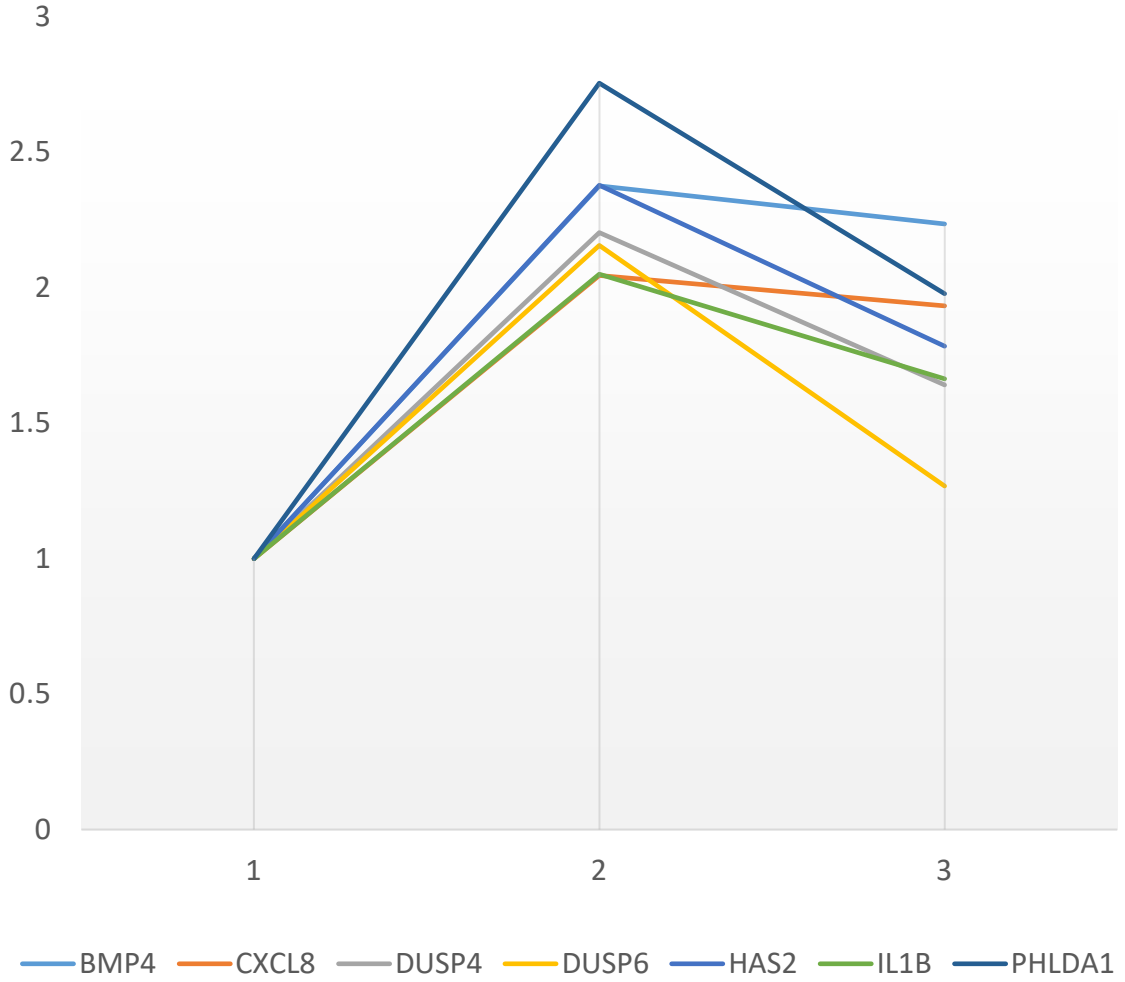
Down Regulated Genes



Time Depended Up Regulation



Up regulated at 30 min



Hs_Activation_of_NLRP3_Inflammasome_by_SARS-CoV-2_WP4876_110321
Hs_Allograft_Rejection_WP2328_106557
Hs_Aryl_Hydrocarbon_Receptor_Pathway_WP2873_106304
Hs_Blood_Clotting_Cascade_WP272_107136
Hs_BMP_Signaling_Pathway_in_Eyelid_Development_WP3927_106309
Hs_Cells_and_Molecules_involved_in_local_acute_inflammatory_response_WP4493_102660
Hs_Corticotropin-releasing_hormone_signaling_pathway_WP2355_108254
Hs_COVID-19_AOP_WP4891_110309
Hs_Cytokines_and_Inflammatory_Response_WP530_96982
Hs_Development_and_heterogeneity_of_the_ILC_family_WP3893_106386
Hs_Differentiation_of_white_and_brown_adipocyte_WP2895_87889
Hs_EBV_LMP1_signaling_WP262_106391
Hs_FBXL10_enhancement_of_MAP-ERK_signaling_in_diffuse_large_B-cell_lymphoma_WP4553_103606
Hs_FGFR3_signalling_in_chondrocyte_proliferation_and_terminal_differentiation_WP4767_110277
Hs_Gastrin_Signaling_Pathway_WP4659_107967
Hs_GDNF-RET_signalling_axis_WP4830_109223
Hs_Hair_Follicle_Development-_Cytodifferentiation_(Part_3_of_3)_WP2840_110704
Hs_IL1_and_megakaryocytes_in_obesity_WP2865_106600
Hs_LTF_danger_signal_response_pathway_WP4478_103756
Hs_Lung_fibrosis_WP3624_110182
Hs_Mammary_gland_development_pathway_-_Puberty_(Stage_2_of_4)_WP2814_102407
Hs_MAPK_Signaling_Pathway_WP382_110569
Hs_Monoamine_Transport_WP727_107191
Hs_Nanomaterial-induced_Inflammasome_Activation_WP3890_110231
Hs_Nonalcoholic_fatty_liver_disease_WP4396_98945
Hs_Oligodendrocyte_Specification_and_differentiation(including_remyelination),_leading_to_Myelin_Components_for_CNS_WP4304_107559
Hs_Overview_of_nanoparticle_effects_WP3287_110681
Hs_Pathogenesis_of_SARS-CoV-2_Mediated_by_nsp9-nsp10_Complex_WP4884_110229
Hs_Photodynamic_therapy-induced_NF-kB_survival_signaling_WP3617_106541
Hs_Platelet-mediated_interactions_with_vascular_and_circulating_cells_WP4462_102079
Hs_Regulation_of_toll-like_receptor_signaling_pathway_WP1449_106494
Hs_Resistin_as_a_regulator_of_inflammation_WP4481_102529
Hs_Senescence_and_Autophagy_in_Cancer_WP615_108116
Hs_Serotonin_Transporter_Activity_WP1455_106692
Hs_Signal_transduction_through_IL1R_WP4496_102693
Hs_Spinal_Cord_Injury_WP2431_106712
Hs_Sudden_Infant_Death_Syndrome_(SIDS)_Susceptibility_Pathways_WP706_106830
Hs_TLR4_Signaling_and_Tolerance_WP3851_105835
Hs_Toll-like_Receptor_Signaling_Pathway_WP75_105842
Hs_Unfolded_protein_response_WP4925_110553

WiKiPathways @ 30min

Hs_Apoptosis-related_network_due_to_altered_Notch3_in_ovarian_cancer_WP2864_108133
Hs_Blood_Clotting_Cascade_WP272_107136
Hs_BMP_Signaling_Pathway_in_Eyelid_Development_WP3927_106309
Hs_Canonical_and_Non-Canonical_TGF-B_signaling_WP3874_106348
Hs_Corticotropin-releasing_hormone_signaling_pathway_WP2355_108254
Hs_Deregulation_of_Rab_and_Rab_Effector_Genes_in_Bladder_Cancer_WP2291_108118
Hs_GDNF-RET_signalling_axis_WP4830_109223
Hs_Genes_targeted_by_miRNAs_in_adipocytes_WP1992_105839
Hs_Heme_Biosynthesis_WP561_107186
Hs_Hypertrophy_Model_WP516_106595
Hs_Integrated_Breast_Cancer_Pathway_WP1984_110683
Hs_LDLRAD4_and_what_we_know_about_it_WP4904_110671
Hs_LncRNA_involvement_in_canonical_Wnt_signaling_and_colorectal_cancer_WP4258_108136
Hs_Mammary_gland_development_pathway_-_Puberty_(Stage_2_of_4)_WP2814_102407
Hs_TGF-beta_Receptor_Signaling_WP560_106477
Hs_TGF-beta_Signaling_Pathway_WP366_108333

WiKiPathways @ 60min

Common WiKiPathways

Hs_Blood_Clotting_Cascade_WP272_107136
Hs_BMP_Signaling_Pathway_in_Eyelid_Development_WP3927_106309
Hs_Corticotropin-releasing_hormone_signaling_pathway_WP2355_108254
Hs_GDNF-RET_signalling_axis_WP4830_109223

赤字は、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRH）のシグナル伝達経路である。CRHは、内分泌ストレス応答の主要なメディエーターであり、さらに炎症反応や血液循環に関与している。

方法2

<酸化ストレスの検出>

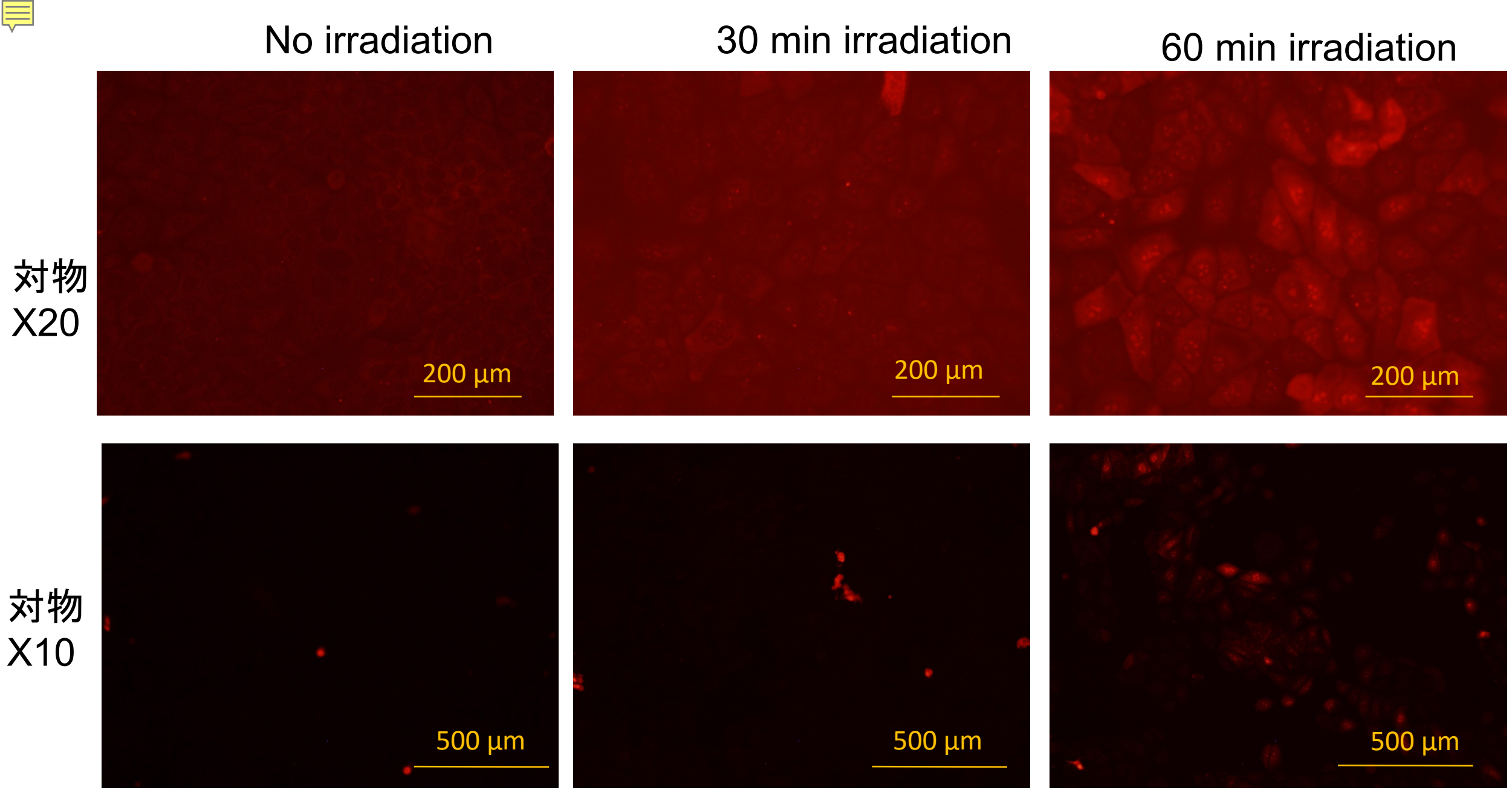
HaCaT細胞をガラス基底ディッシュに植え、アルミホイルで作成した筒中に配置し、定常状態HaCaT細胞にWizLaser®の光源（＜0.5 mW）を30分および60分間照射した。照射30分後すべてのHaCaT細胞にMitoSOX™ Red Mitochondrial Indicator for live-cell imaging 試薬（Thermo Fisher Scientific）を滴下し、正立顕微鏡 OLYMPUS BX51 (X10, X20)を用いて撮影した。

方法2

＜免疫化学的解析＞

HaCaT細胞をガラス基底ディッシュに植え、アルミホイルで作成した筒中に配置し、定常状態HaCaT細胞にWizLaser®の光源（＜0.5 mW）を60分間照射し、照射開始から24時間培養後4% パラホルムアルデヒドを含むPBSで固定した。一次抗体および二次抗体を用いて染色し、FV 3000共焦点レーザー走査型顕微鏡（x 100油性対物レンズ)を用いて撮影した。

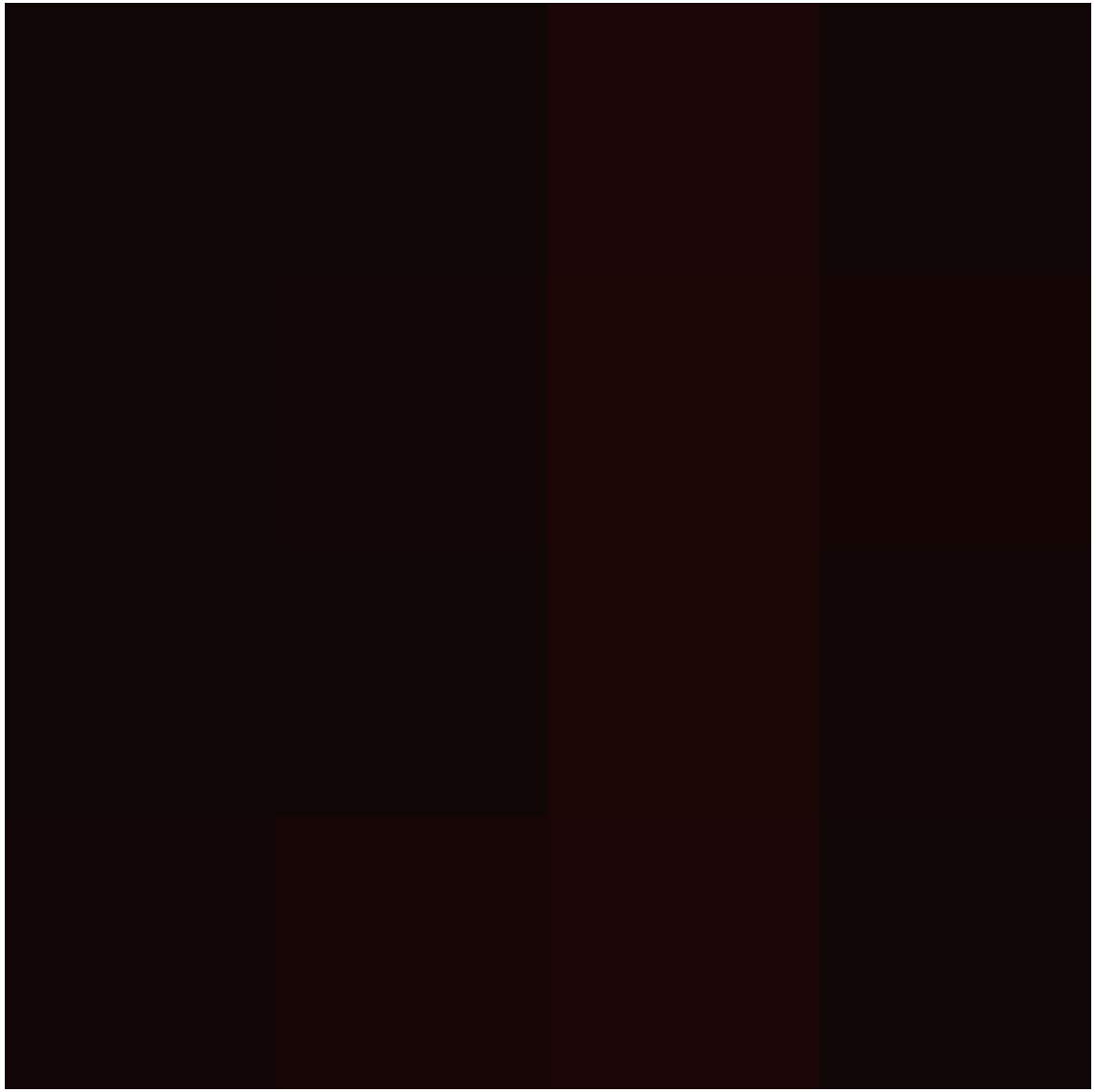
一次抗体	二次抗体
TRPV-1, anti-TRIPV1-P	Alexa Fluoro® 594



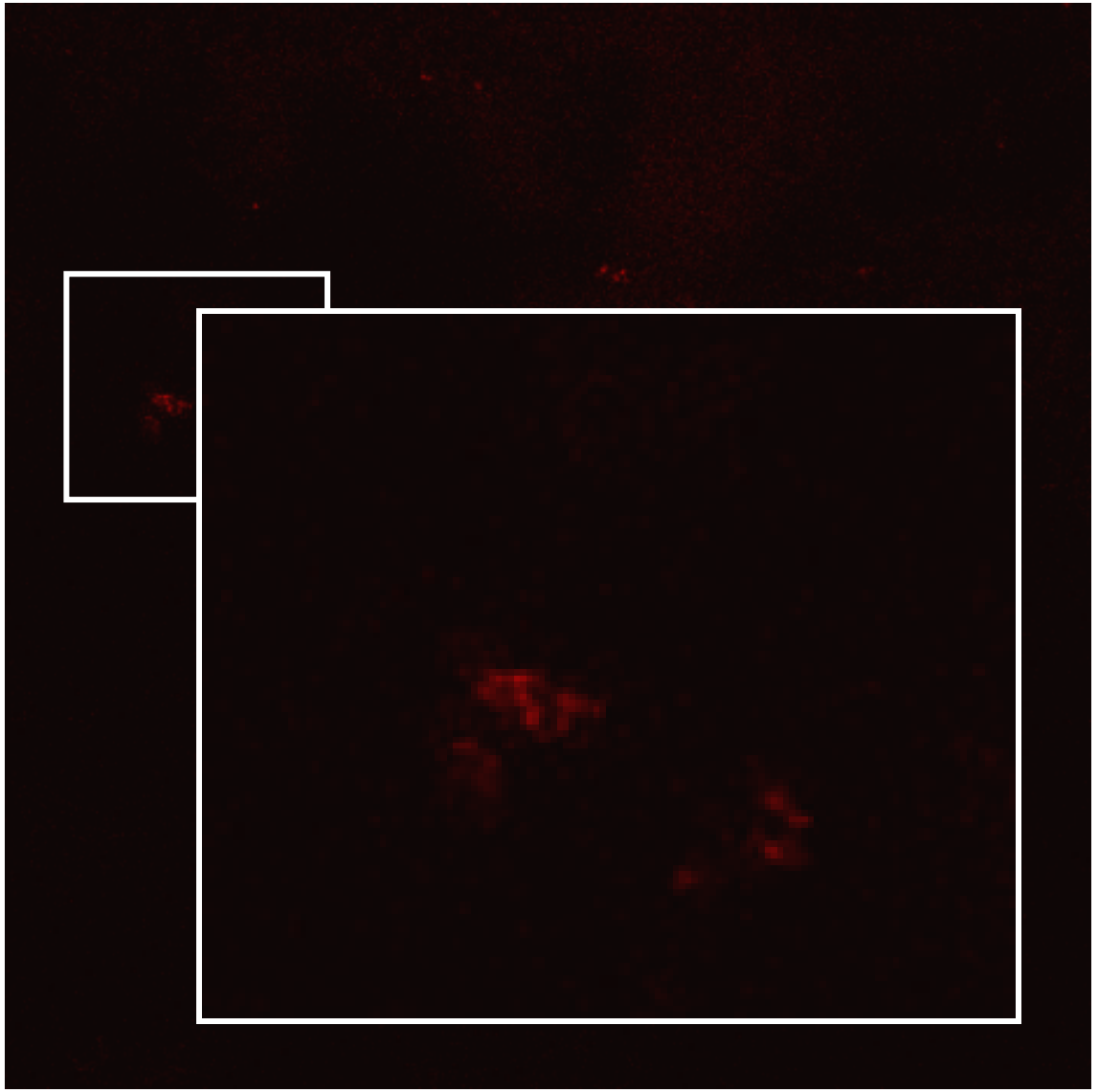
MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator

HaCaT

anti-TRPV-1 x500, Alexa Fluor™ 594 anti-rabbit x200 0min

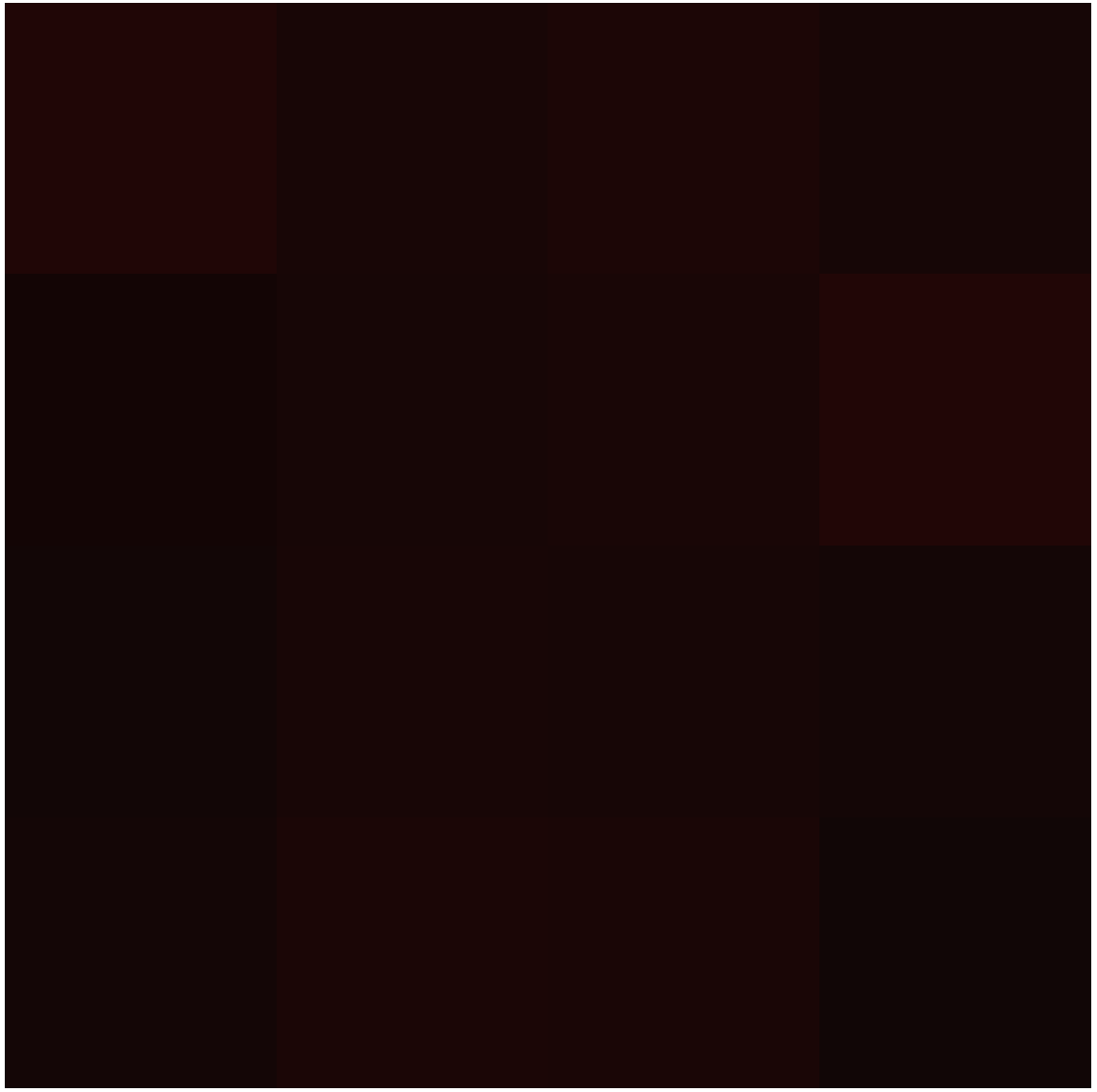


Irradiation 60min

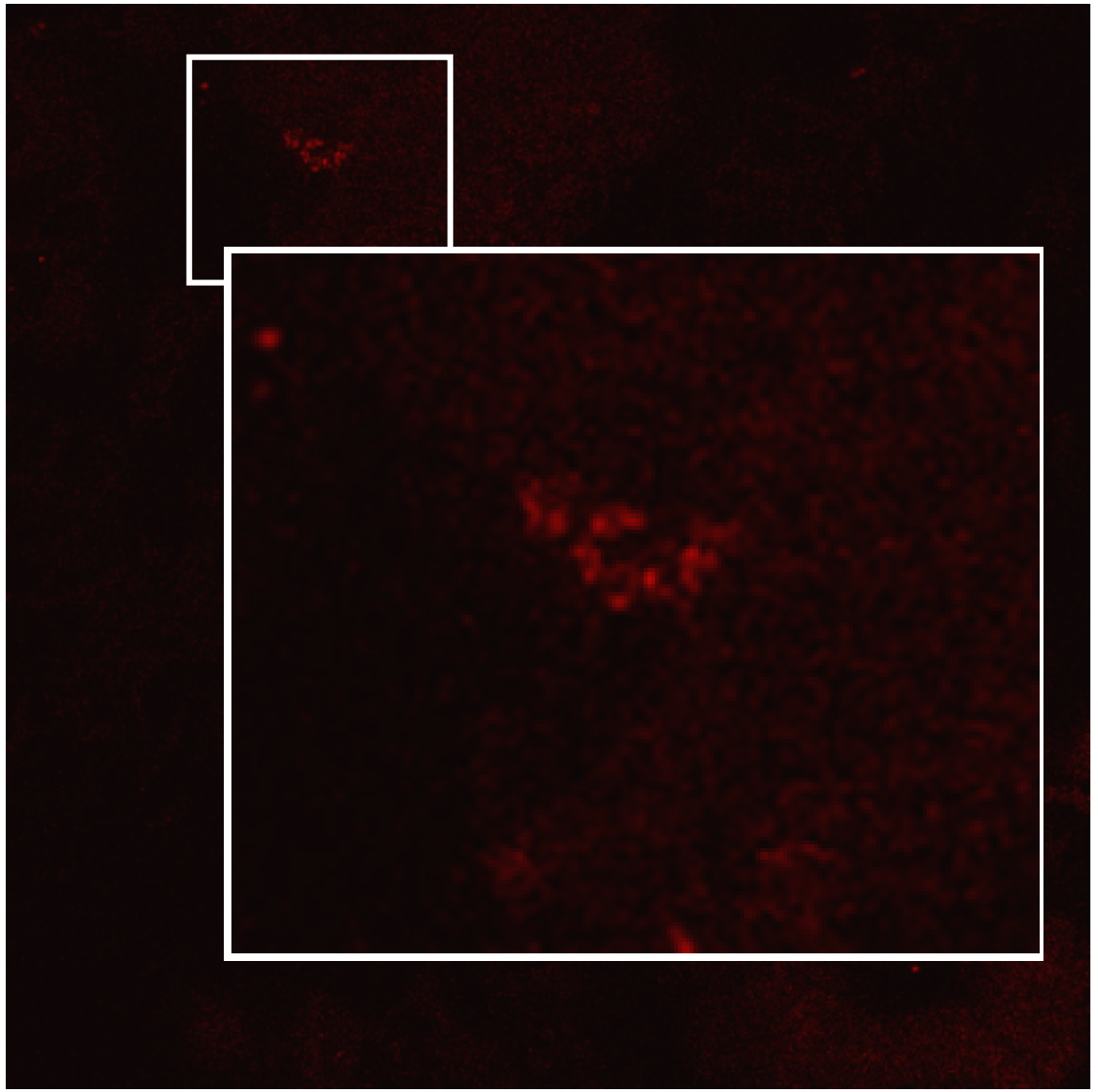


HaCaT

anti-TRIPV1-P x500, Alexa Fluor™ 594 anti-rabbit x200　0min



Irradiation 60min



結果

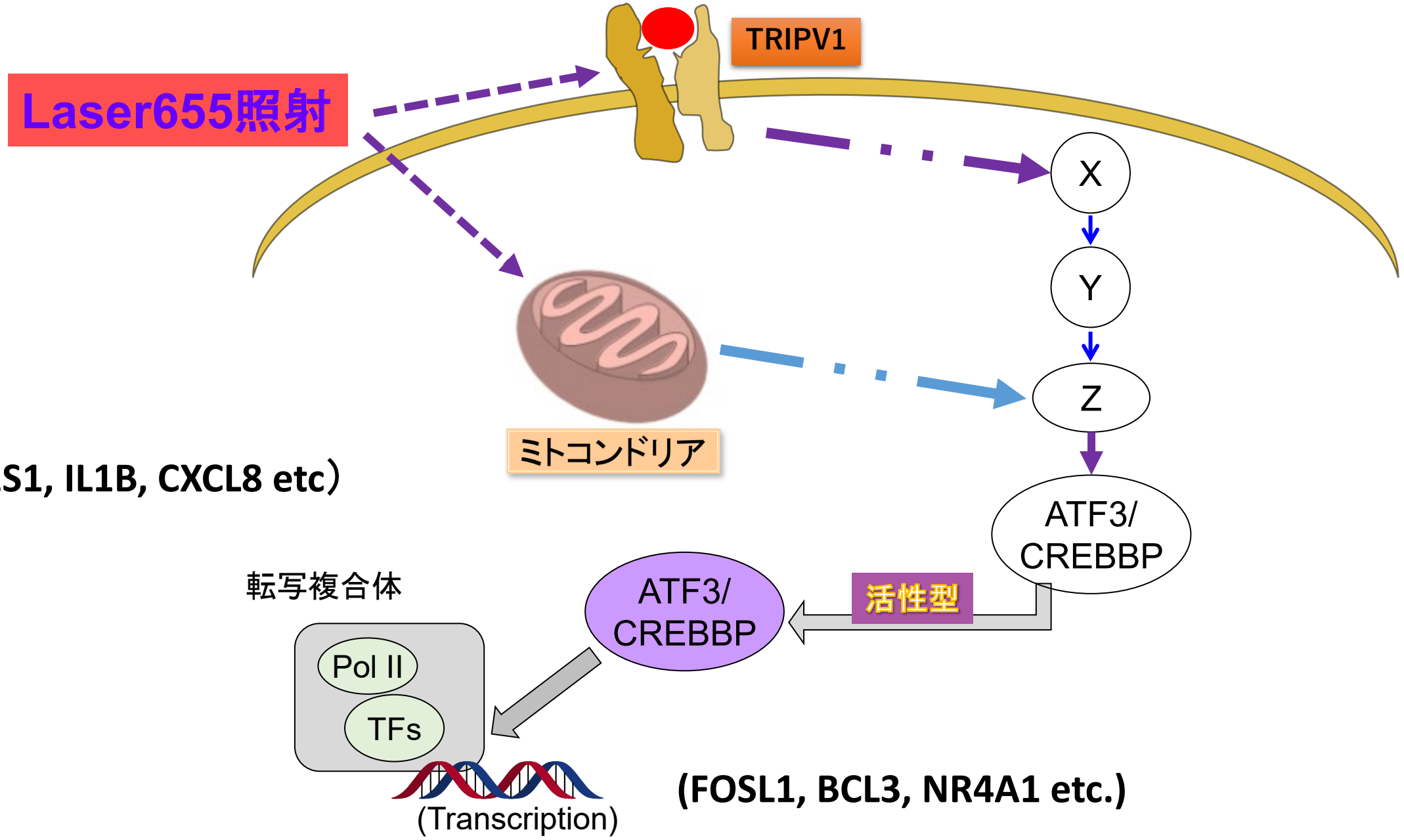
＜方法1＞
マイクロアレイ解析結果より、正の調節を受けた遺伝子群にはストレス応答、炎症、細胞増殖及びアポトーシス等の細胞活動に関与していることが示された。

＜方法2＞
HaCaT細胞への60分間照射により、照射なしと比較し、ミトコンドリアの活性酸素、TRPV1およびTRIPV1-Pの増加傾向が確認された。

考察

655 nmのレーザーの照射は、照射時間依存的にミトコンドリアの活性を引き起こし、細胞内シグナル伝達が起こったと考えられる。また、TRPV1およびTRIPV1-Pの増加傾向よりレーザーを誤認して炎症反応を引き起こしたと考えられる。

Laser655照射はATF3/CREBBPを介して遺伝子の転写を調節する?



（？CYP2S1, IL1B, CXCL8 etc）

(FOSL1, BCL3, NR4A1 etc.)

結論

今回の健康機器は細胞障害が起きていないのにも関わらず、レーザーの照射によって炎症反応を引き起こして、細胞増殖を促進しようとしていることが考えられる。

よって、時間と照射出力に注意すれば人体に有用な作用をもたらすと考えられるが、その明確な機序の特定にはいたらなかった。