

# 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

## 目次

|             |     |
|-------------|-----|
| 要旨 .....    | 1   |
| 背景・目的 ..... | 2   |
| 方法 .....    | 3-4 |
| 結果 .....    | 5-7 |
| 考察 .....    | 7   |
| 結論 .....    | 8   |
| 参考文献 .....  | 8   |

2021 年度

|  |   |    |  |
|--|---|----|--|
| 学籍番号   |   | 氏名 |  |
| 所属研究室  | 機能生理化学研究室                                 |    |  |
| 研究テーマ  | 655 nm Laser の照射が HaCaT 細胞の遺伝子発現に及ぼす影響の検証 |    |  |
| 研究概要   |   |    |  |
| <p><b>【目的】</b> 株式会社シーワンテック社の WizLaser®は、赤色可視光の 655 nm のレーザーを使用した、腕時計型の健康美容製品である。一方、Low-reactive Level Laser Therapy (LLLT) と呼ばれる低出力レーザー治療は創傷治癒の促進や炎症の緩和など様々な生物学的効果が報告されている。本研究では、LLLT の更に 1/10~1/20 程度(0.5 mW x 60 sec x 60 =1800 mJ=1.8 J)の WizLaser® のレーザー光が、HaCaT 細胞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、生物作用を評価した。</p> <p><b>【方法】</b> HaCaT 細胞をアムホテリシン B (Sigma, 50 µg/mL)、ゲンタマイシン (Sigma, 50 µg/mL)、FBS を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose 培地中で 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。コンフルエントの HaCaT 細胞に ① WizLaser®の光源 (&lt;0.5 mW) を 30 分、60 分照射し、および照射なしの HaCaT 細胞 (150 平方センチ) を集め、終濃度 100 µg/mL の cycloheximide、1 mM DTT 及び 40 U の recombinant RNase inhibitor (TAKARA) 存在下、細胞を 375 µL の Low-salt buffer (LSB) (0.1 M NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl [pH 7.6] 1 mM DTT) で懸濁し、100 µL の Lysis buffer (LSB : 0.2 M sucrose, 1.2 % Triton N-101) の添加により膜結合型ポリソームを遊離し、更に 15 µL の 5 M NaCl の添加により細胞骨格結合型ポリソームを遊離し、30,000×g で 5 分間遠心分離し、得た細胞質に 50 µL の 10 mg/mL heparin-Na を添加してポリソームの安定化を図った。得られた細胞質を LSB 中での 0.5~1.5 M sucrose 密度勾配遠心法 (47,000 rpm、70 分間 4°C、(RPS 55ST, Hitachi)) により分離し、254 nm の吸光度をモニターしながら 10 分画に分取し、mRNA あたり 3 個以上のリボソームが結合している mRNA を含む画分から、全 RNA を抽出し、網羅的 DNA マイクロアレイ解析をフィルジェン株式会社に委託した。② 細胞をガラス基底ディッシュに植え、コンフルエントに到達後、pH 指示薬を含まない D-MEM (high glucose) 培地に交換した。ガラス基底ディッシュをアルミホイルで作成した筒中に配置し、WizLaser®の光源 (&lt;0.5 mW) を 30 分および 60 分間照射した。照射 30 分後に MitoSOX™ Red Mitochondrial Indicator for live-cell imaging 試薬 (Thermo Fisher Scientific) を滴下し、30 分と 60 分で観察した。</p> <p><b>【結果】</b> 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。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の増加傾向が確認された。</p> <p><b>【考察】</b> コンフルエント状態の HaCaT 細胞にレーザーを照射することで、ミトコンドリアの活性酸素が増加し、細胞内のシグナル伝達が起こったと考えられる。</p> <p><b>【結論】</b> 655 nm (0.5 mW x 60 sec x 60 =1800 mJ=1.8 J) 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た。その遺伝子は、ストレス応答、炎症、細胞増殖及びアポトーシス等への関与が知られていることから、そのメカニズムについて考察したい。</p> <p><b>【参考文献】</b> レーザー健康機器   製品一覧   レーザー時計のシーワンテック (c-onetec.com)</p> |   |    |  |

## 【背景・目的】

株式会社シーワンテック社の WizLaser®は、経済産業省省令消費生活用品安全法適合「携帯用レーザー応用装置」PSC マーク認証の赤色可視光の 655 nm のレーザーを使用した、腕時計型の健康美容製品である (<https://c-onetec.com/product-list/laser-watch/>)<sup>1)</sup>。腕時計裏の照射窓からレーザーを照射 30 分後に自動で切れる設計となっている。一方、Low-reactive Level Laser Therapy (LLLT) と呼ばれる低出力レーザー治療は創傷治癒の促進や炎症の緩和など様々な生物学的効果が報告されている<sup>2)</sup>。LLLT に比べ WizLaser®によるレーザー照射のエネルギーは数十分の一程度となっているが、ヒト皮膚細胞の遺伝子発現へ及ぼす影響は不明な点が多い。本研究では、LLLT の 1/10~1/20 程度 (0.5 mW x 60 sec x 60 =1800 mJ=1.8 J) の WizLaser®のレーザー光を、HaCaT 細胞へ照射後、各遺伝子 mRNA へのリボソーム結合へ及ぼす影響を網羅的に解析することにより、生物作用を評価した。

図1 レーザー健康美容製品"WizLaser®"



## 【方 法】

## 1. 細胞培養及びレーザー照射

HaCaT (human immortalized keratinocyte) 細胞をアムホテリシン B (Sigma, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、ゲンタマイシン (Sigma, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、FBS を含む Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium D-MEM high glucose 培地中で 37 °C、5 %  $\text{CO}_2$  存在下で培養した。直径 100mm のディッシュ 2 枚で培養したコンフルエントの HaCaT 細胞に pH 指示薬を含まない D-MEM high glucose with sodium pyruvate, without amino acids 培地に sodium pyruvate 及び amino acids を補填した培地へ交換後、WizLaser®の光源 (<0.5 mW) を載せ、アルミホイルで包んだ後 30 分又は 60 分の照射を行い、照射開始から 4 時間後に cycloheximide (Sigma, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の存在下で HaCaT 細胞を集めた。対照としてレーザーを発光しない WizLaser®光源を用いて同様に操作した HaCaT 細胞を集めた。

## 2. ポリソームの DNA マイクロアレイ解析を用いた Translatome 解析

細胞は Low-salt buffer (LSB) (0.1 M NaCl, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM Tris-HCl [pH 7.6] 1 mM DTT) 375  $\mu\text{L}$  にて、終濃度 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の cycloheximide、1 mM DTT 及び 40 U の recombinant RNase inhibitor (TAKARA) 存在下で懸濁した。次に、100  $\mu\text{L}$  の Lysis buffer (LSB、0.2 M sucrose、1.2 % Triton N-101) の添加により膜結合型ポリソーム遊離を促し、更に 15  $\mu\text{L}$  の 5 M NaCl の添加により細胞骨格結合型ポリソームの遊離を促した。細胞溶解液を、30,000 $\times g$  で 5 分間遠心分離し、得た細胞質画分に 50  $\mu\text{L}$  の 10 mg/mL heparin-Na を添加してポリソームの安定化を図った。得られた細胞質画分を更に LSB 中での 0.5~1.5 M sucrose 密度勾配遠心法 (47,000 rpm、70 分間 4° C、(RPS 55ST, Hitachi)) により分離し、254 nm の吸光度をモニターしながら 10 分画に分取し、mRNA あたり 3 個以上のリボソームが結合している mRNA を含む画分から、全 RNA を抽出し、全 RNA の DNA マイクロアレイ解析 (Clarion™ S Assay, Human, Thermo Fisher Scientific, Inc.) をフィルジェン株式会社に委託した。

### 3. 酸化ストレスの検出

細胞を 50mm ガラス基底ディッシュ (Iwaki) に繁殖し、コンフルエントに到達後、pH 指示薬を含まない D-MEM high glucose with sodium pyruvate, without amino acids 培地に sodium pyruvate 及び amino acids を補填した培地に交換した。ガラス基底ディッシュをアルミホイルで作成した筒中に配置し、WizLaser®の光源 (<0.5 mW) を 30 分および 60 分間照射した。照射 30 分後に MitoSOX™ Red Mitochondrial Indicator for live-cell imaging 試薬 (Thermo Fisher Scientific) を滴下し、照射開始から 60 分後に蛍光顕微鏡 (Olympus, BX51, x10 対物レンズ) にて撮影した。

### 4. 免疫細胞化学的解析

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 (anti-TRPV-1 および anti-TRPV1-P、堀江俊治教授より供与) および二次抗体 (Alexa Fluoro® 594) 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。

### 5. ChIP-Atlas を利用した解析

Web サービス (ChIP-Atlas; <https://chip-atlas.org>) を用いて、フィルジェン株式会社より得られた遺伝子データから、重複する転写因子と pq 座の解析を行った。

## 【結 果】

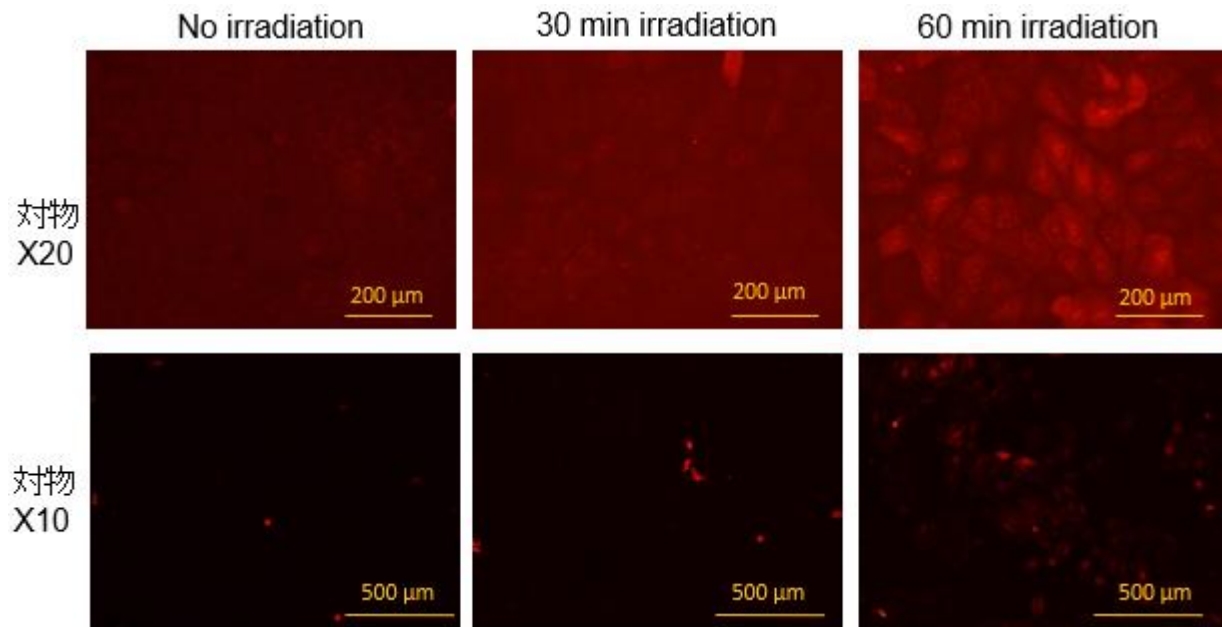
表 1 フィルジェン株式会社による遺伝子データの解析 30 分後（上）および 60 分後（下）

| Ratio flag | Gene Accession   | Gene Symbol | Gene Description  | Chromosome | pq Location    |
|------------|------------------|-------------|---|------------|----------------|
| 2Up        | NM_030622        | CYP2S1      | cytochrome P450, family 2, subfamily S, polypeptide 1                   | chr19      | 19q13.2        |
| 2Up        | NM_007350        | PHLDA1      | pleckstrin homology-like domain, family A, member 1                     | chr12      | 12q21.2        |
| 2Up        | NM_001300844     | FOSL1       | FOS-like antigen 1  | chr11      | 11q13.1        |
| 2Up        | NM_005328        | HAS2        | hyaluronan synthase 2   | chr8       | 8q24.13        |
| 2Up        | NM_001202        | BMP4        | bone morphogenetic protein 4  | chr14      | 14q22.2        |
| 2Up        | NM_001143818     | SERPINB2    | serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2               | chr18      | 18q21.33-q22.1 |
| 2Up        | NM_001394        | DUSP4       | dual specificity phosphatase 4  | chr8       | 8p12           |
| 2Up        | NM_001946        | DUSP6       | dual specificity phosphatase 6  | chr12      | 12q21.33       |
| 2Up        | NM_001162893     | KIAA0040    | KIAA0040  | chr1       | 1q25.1         |
| 2Up        | NM_000576        | IL1B        | interleukin 1 beta  | chr2       | 2q14.1         |
| 2Up        | NM_000584        | CXCL8       | chemokine (C-X-C motif) ligand 8  | chr4       | 4q13.3         |
| 2Down      | NM_152367        | MAB21L3     | mab-21-like 3 (C. elegans)  | chr1       | 1p13.1         |
| 2Down      | NM_014810        | CEP350      | centrosomal protein 350kDa  | chr1       | 1q25.2         |
| 2Down      | hsa_circ_0000013 | ENO1        | Memczak2013 ANTISENSE, coding, INTERNAL, UTR3 best transcript NM_001428 | chr1       | 1p36.23        |

| Ratio flag | Gene Accession | Gene Symbol | Gene Description  | Chromosome | pq Location    |
|------------|----------------|-------------|---|------------|----------------|
| 2Up        | NM_001030287   | ATF3        | activating transcription factor 3                                   | chr1       | 1q32.3         |
| 2Up        | NM_005178      | BCL3        | B-cell CLL/lymphoma 3   | chr19      | 19q13.32       |
| 2Up        | NM_001202      | BMP4        | bone morphogenetic protein 4  | chr14      | 14q22.2        |
| 2Up        | NM_030622      | CYP2S1      | cytochrome P450, family 2, subfamily S, polypeptide 1               | chr19      | 19q13.2        |
| 2Up        | NM_001300844   | FOSL1       | FOS-like antigen 1  | chr11      | 11q13.1        |
| 2Up        | NM_001162893   | KIAA0040    | KIAA0040  | chr1       | 1q25.1         |
| 2Up        | NM_014181      | LGALS1      | lectin, galactoside-binding-like                                    | chr2       | 2p14           |
| 2Up        | NM_001202233   | NR4A1       | nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1                     | chr12      | 12q13.13       |
| 2Up        | NM_001143818   | SERPINB2    | serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2           | chr18      | 18q21.33-q22.1 |
| 2Up        | NM_001257180   | SLC20A2     | solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 2          | chr8       | 8p11.21        |
| 2Up        | NM_001278503   | STT3A       | STT3A, subunit of the oligosaccharyltransferase complex (catalytic) | chr11      | 11q24.2        |
| 2Up        | NM_001024847   | TGFBR2      | transforming growth factor beta receptor II                         | chr3       | 3p24.1         |
| 2Up        | NM_014452      | TNFRSF21    | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21               | chr6       | 6p12.3         |
| 2Down      | NM_000031      | ALAD        | aminolevulinic acid dehydratase                                     | chr9       | 9q32           |
| 2Down      | NM_014810      | CEP350      | centrosomal protein 350kDa  | chr1       | 1q25.2         |
| 2Down      | NM_001098525   | CKAP2       | cytoskeleton associated protein 2                                   | chr13      | 13q14.3        |
| 2Down      | NM_001079520   | DACT1       | dishevelled-binding antagonist of beta-catenin 1                    | chr14      | 14q23.1        |
| 2Down      | NM_001308019   | EXPH5       | exophilin 5   | chr11      | 11q22.3        |
| 2Down      | NM_152367      | MAB21L3     | mab-21-like 3 (C. elegans)  | chr1       | 1p13.1         |
| 2Down      | NM_024320      | PRR15L      | proline rich 15-like  | chr17      | 17q21.32       |

赤色可視光の 655 nm のレーザーを 30 分間受けた HaCaT 細胞に於いて負の遺伝子発現の調節を受けた 3 つ遺伝子は chr 1 に限定された (表 1 上)。その内 MAB21L3 と CEP350 は 60 分照射でも負の調節が確認された。また、ChIP-Atlas を利用した転写因子の解析より、これら殆どの遺伝子について ATF3 と CREBBP が重複して調節する可能性が示された。

図 1 MitoSOX™ Red Mitochondrial Indicator for live-cell imaging を用いた解析



HaCaT 細胞へ 655 nm のレーザー光の 30 分間あるいは 60 分間照射 ( $0.5 \text{ mW} \times 60 \text{ sec} \times 60 = 1800 \text{ mJ} = 1.8 \text{ J}$ ) により、照射なしに比し、照射開始から 60 分後においてミトコンドリアの活性酸素の増加傾向が確認された。(図 1)

図 2 HaCaT 細胞における anti-TRPV-1 および anti-TRPV1-P の免疫化学的解析

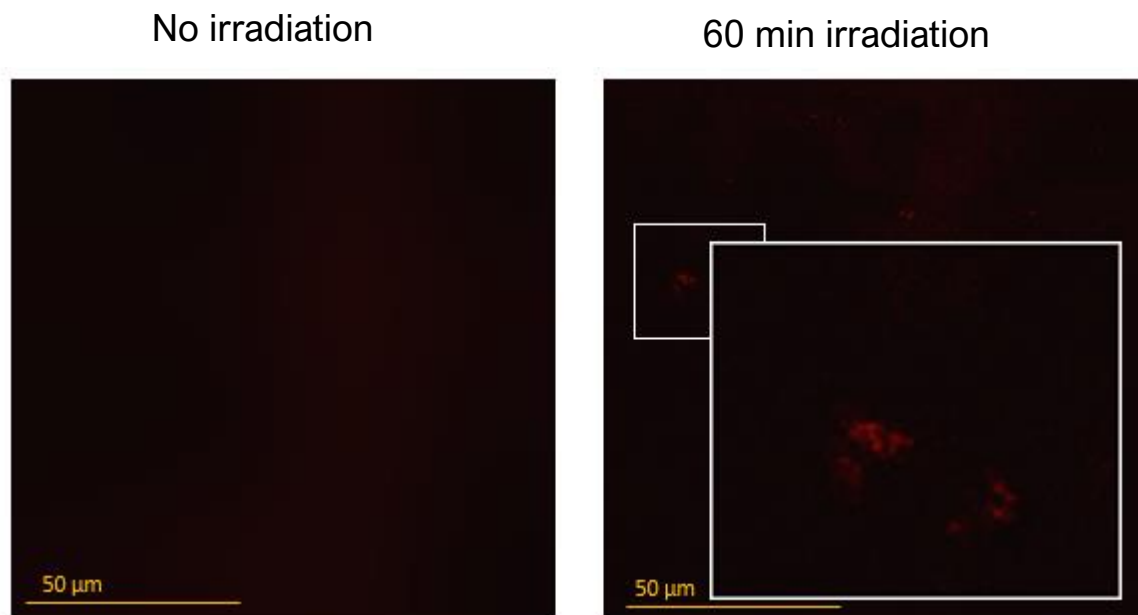


図 2A anti-TRPV-1 x500, Alexa Fluor™ 594 anti-rabbit x200



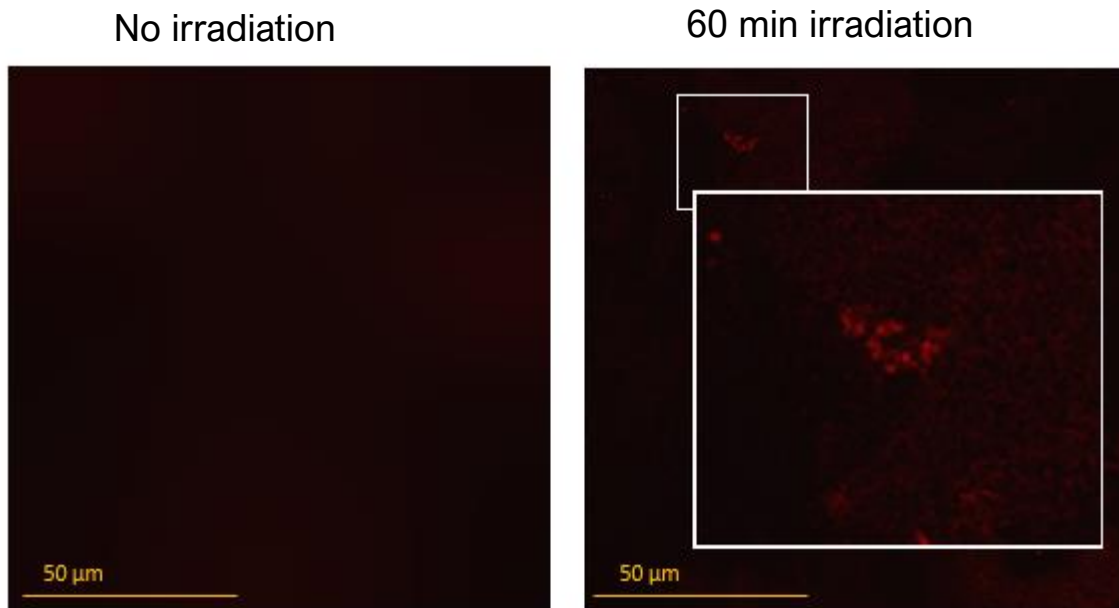


図 2B anti-TRPV1-P x500, Alexa Fluor™ 594 anti-rabbit x200

HaCaT 細胞へ 655 nm のレーザー光の 60 分間照射 ( $0.5 \text{ mW} \times 60 \text{ sec} \times 60 = 1800 \text{ mJ} = 1.8 \text{ J}$ ) により、照射なしに比し、照射開始から 24 時間後において anti-TRPV-1 (図 2A) , TRPV-1 (図 2B) それぞれ交差性の顕在化が確認された。

### 【考 察】

655 nm のレーザー光照射により遺伝子発現の調節を受けた遺伝子の発現調節機構は ChIP-Atlas を利用した解析から、殆どの遺伝子に共通して、カルシウムの流入に始まる cAMP をセカンドメッセンジャーとする転写因子 (ATF3、CERBCP 等) によって調節されることが考えられる。今回得られた MitoSOX 及び anti-TRPV-1 および anti-TRPV1-P の免疫化学的解析結果と考え合わせると、655 nm のレーザー光の照射は TRIPV-1 を介して、 $\text{Ca}^{2+}$  の細胞質への流入増加、cAMP 合成の誘導ついで cAMP に依存する転写因子により転写が誘導されたと考えられる。

## 【結 論】

Laser 照射により遺伝子発現の調節を受けた遺伝子の遺伝子座位より、Chr 上で限定された分布を示したことから、655 nm のレーザー光照射により特定の Chr 位置のエピジェネティックな性質を変化させる仕組みも存在すると予想される。このうち、カルシウムの流入に始まる cAMP をセカンドメッセンジャーとする転写因子群 (ATF3、CREBBP 等) の誘導は様々な波長のレーザー照射で観察されたため、655 nm のレーザー光照射により特定の Chr 位置のエピジェネティックな性質を変化させる仕組みを確認するために、今後は TRPV-1 の集束に関わる細胞骨格因子を明らかにすべきと考える。

. .

## 【謝 辞】

本研究において、WizLaser®の光源の提供をして頂いたシーワンテック社、anti-TRPV-1 および anti-TRPV1-P を頂いた薬理学研究室の堀江俊治教授、助言や協力をして頂いた機能生理化学研究室内の懸川友人教授、額賀路嘉教授、ならびに同研究室の皆様へ感謝いたします。

## 【参考文献】

- 1) レーザー健康機器 | 製品一覧 | レーザー時計のシーワンテック (c-onetec.com)  
<https://c-onetec.com/product-list/laser-watch/>
- 2) 中山 瑛子, 櫛引 俊宏, 真弓 芳稲, 土屋 壮登, 東 隆一, 清澤 智晴, 石原 美弥: 総説 形成外科・皮膚科領域の Photobiomodulation Therapy. 日本レーザー医学会誌, 41 巻 4 号, 2021 年, p. 370-384.
- 3) Evan ELebovitz, Jason M Keller, Hal krisztian Kaszas, Dragan Maric and Michael J ladarola: Positive allosteric modulation of TRPV1 as a novel analgesic mechanism. Lebovitz et al. *Molecular Pain* 2021, 8:70.
- 4) Rebeca Juarez-Contreras, Karina Angelica Mendez-Resendiz, Tamara Rosenbaum, Ricardo Gonzalez-Ramirez, Sara Luz Morales-Lazaro: TRPV1 Channel: A Noxious Signal Transducer That Affects Mitochondrial Function. *International journal of molecular sciences*. 2020 Nov 24;21(23):8882.