

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

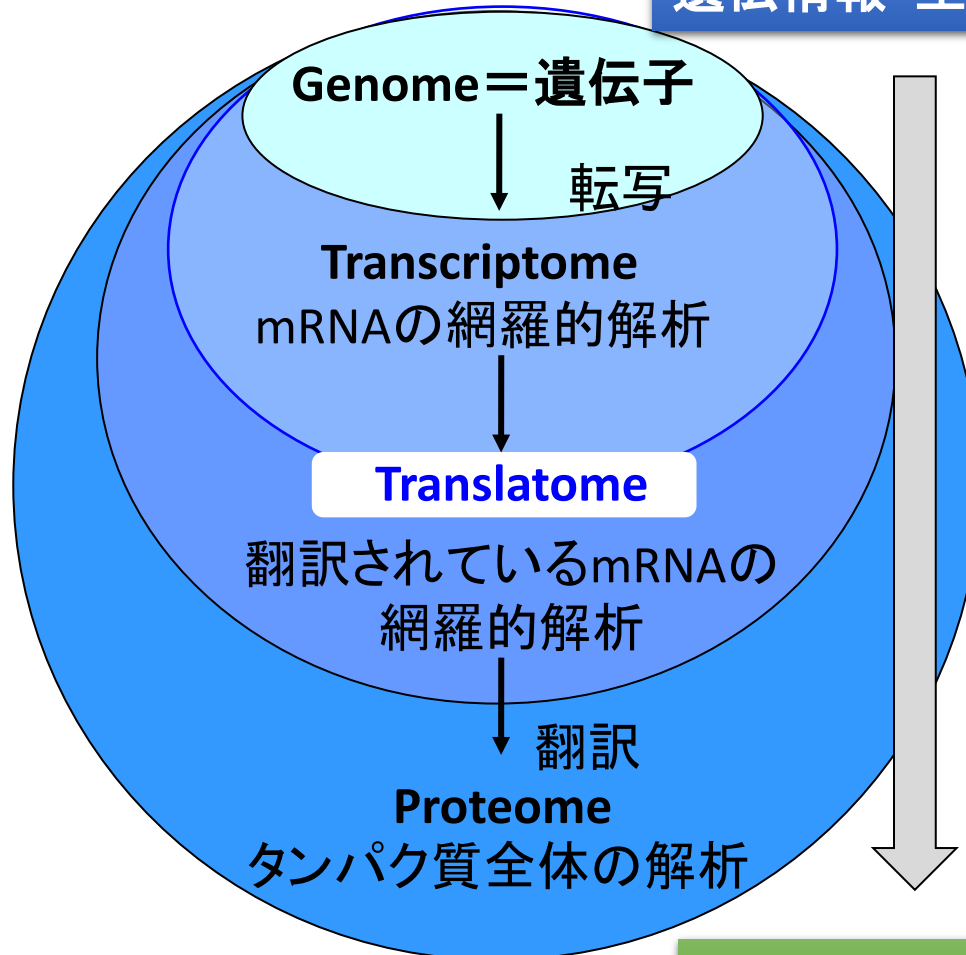
レーザー650nm Laser Class2 製品

レーザー650nm Level2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。

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。

遺伝情報=生命の設計図



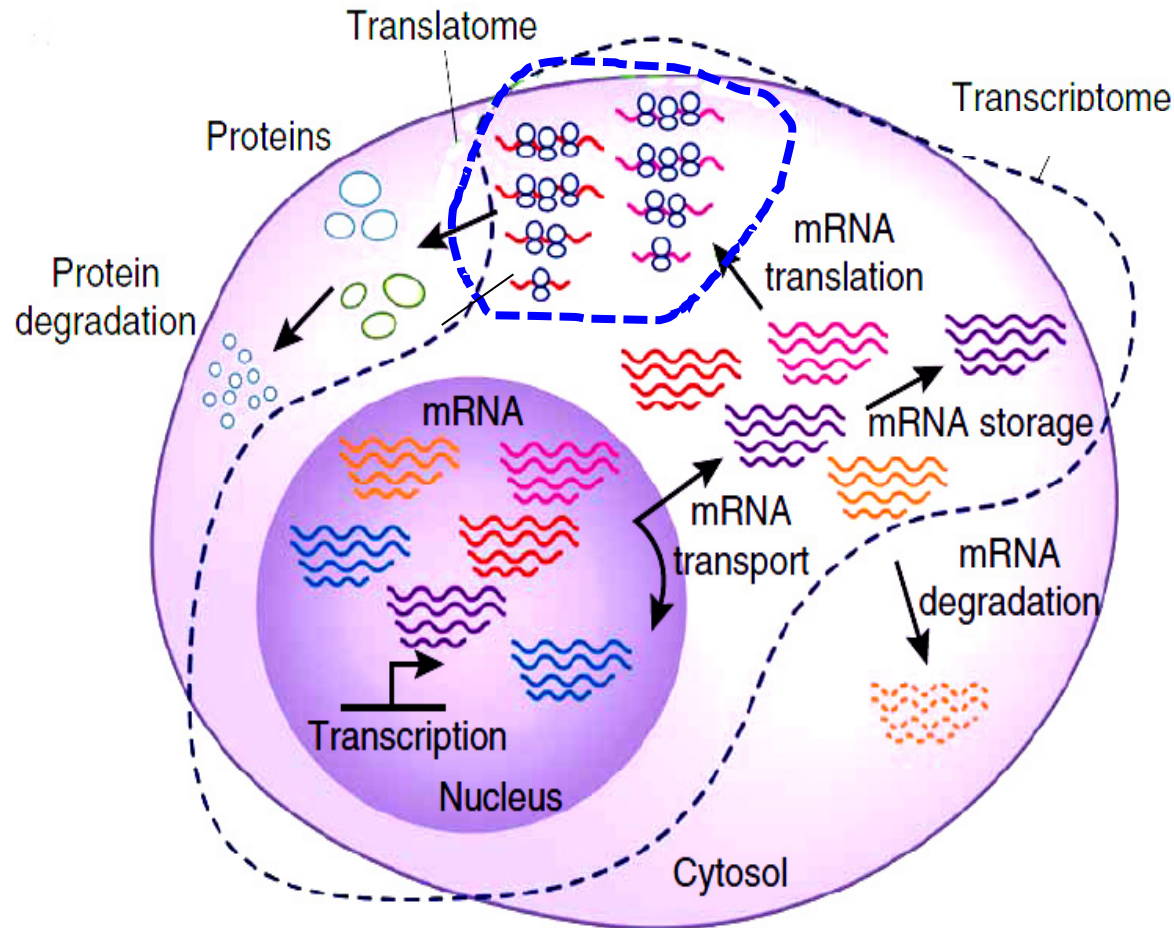
その中で、Translatomeの変化を解析することで、生体や細胞の代謝がどの方向へ向かおうとしているか、類推することが可能となります。

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。

タンパク質 = 生命活動の本質

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

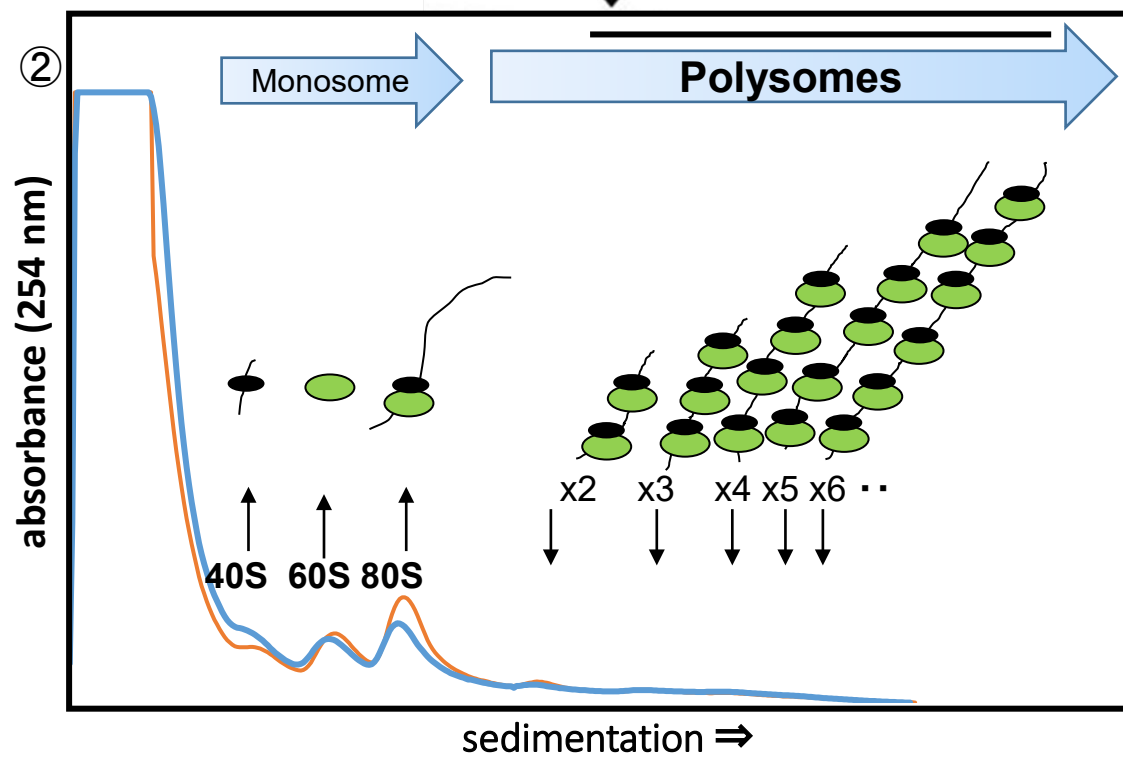
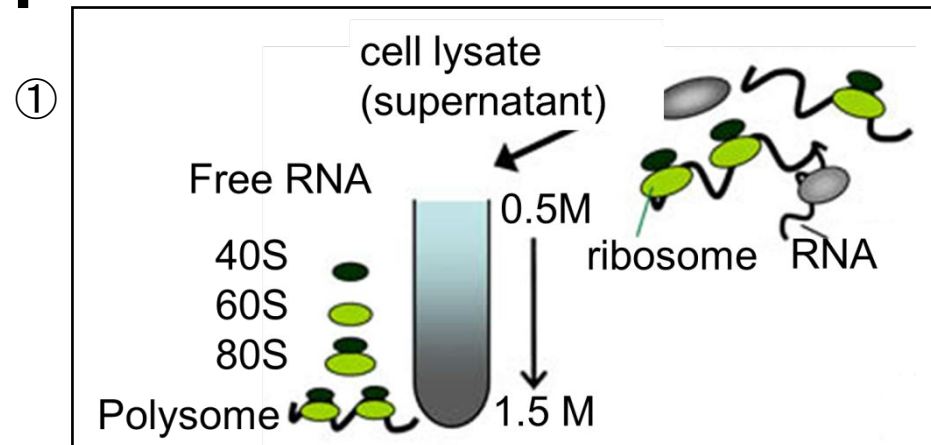
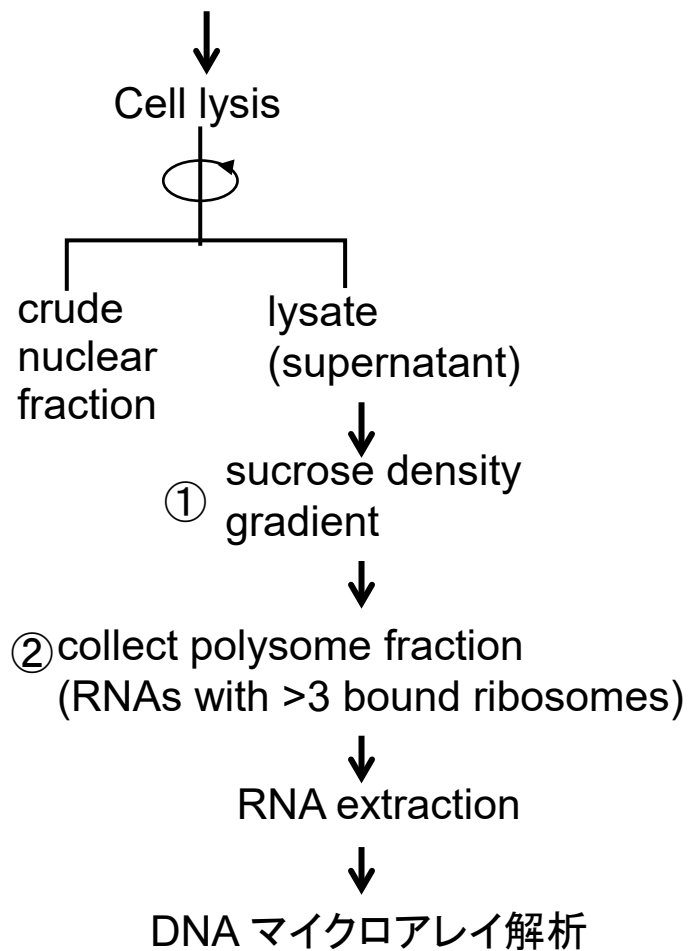
翻訳は細胞質中とミクロソームの膜上のポリソームで行われるので、そこから翻訳中、タンパク質合成の場であるリボソームが3つ以上結合したmRNAを分離・抽出する。

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

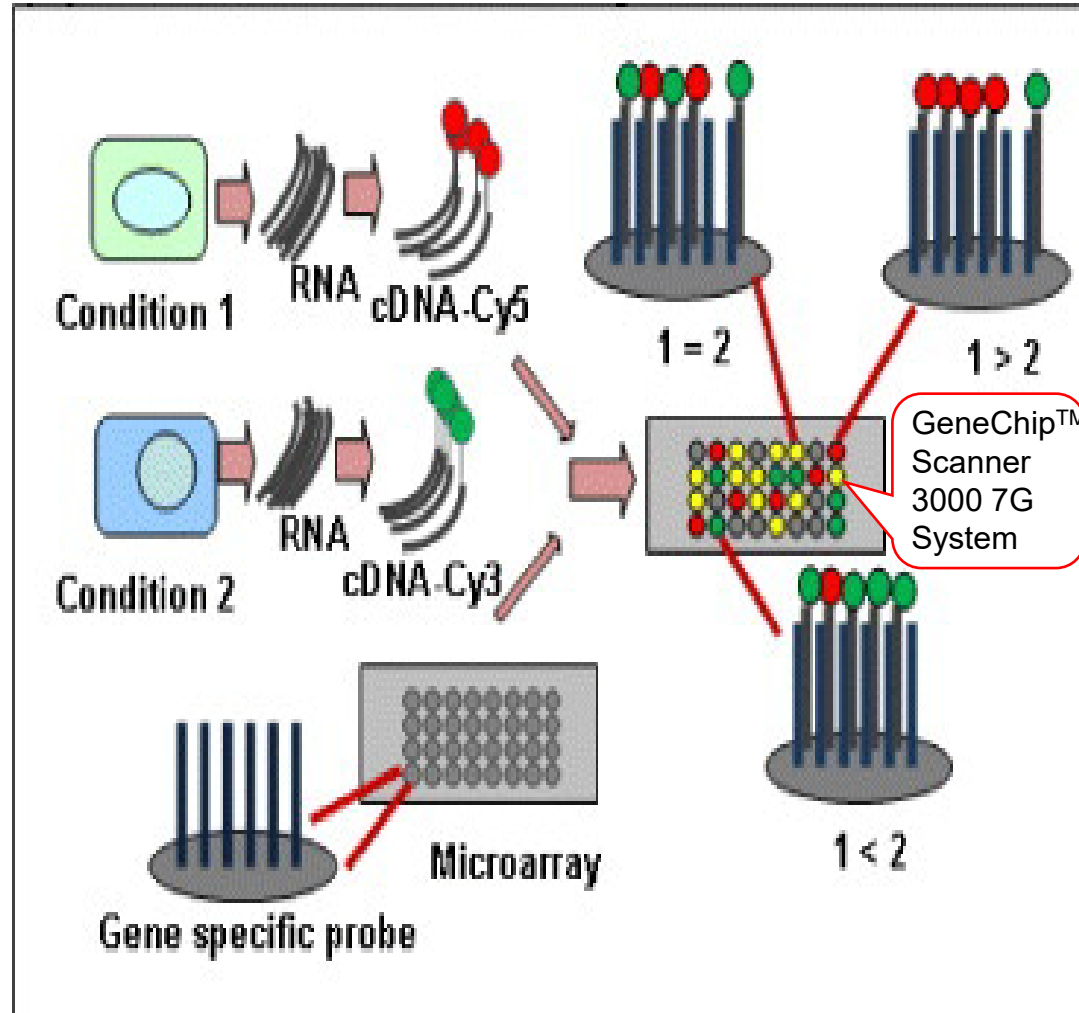
方法1

HaCaT cells、レーザー照射
0分,30分,60分



方法1

DNAマイクロアレイ解析



Clariom™ D Assay

non-coding RNAや
選択的スプライシング
によるスプライシング
バリエーション検出

Transcriptome Analysis Console (TAC) ソフトウェア

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

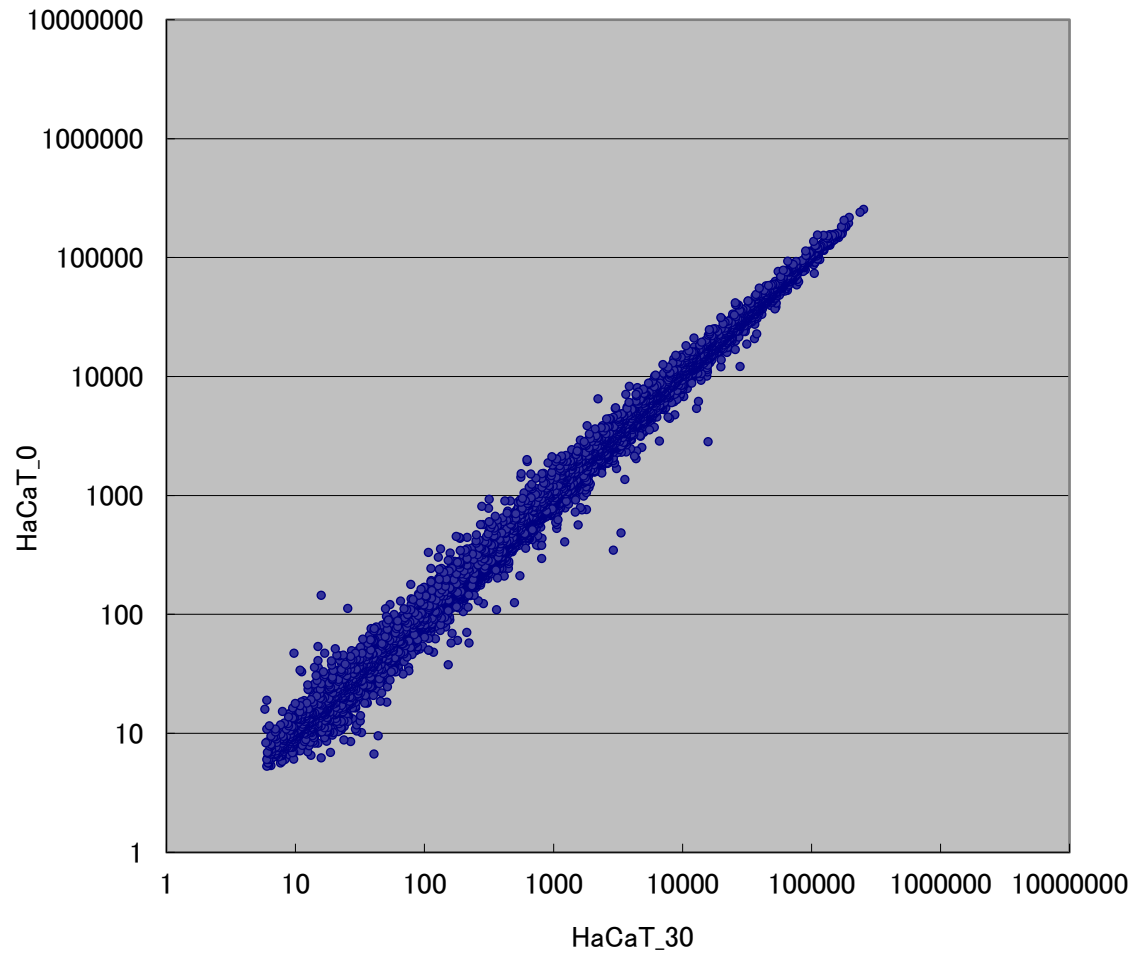
複雑な選択的スプ
ライシング事象の
解釈

バイオマーカー探索
に最適なツール

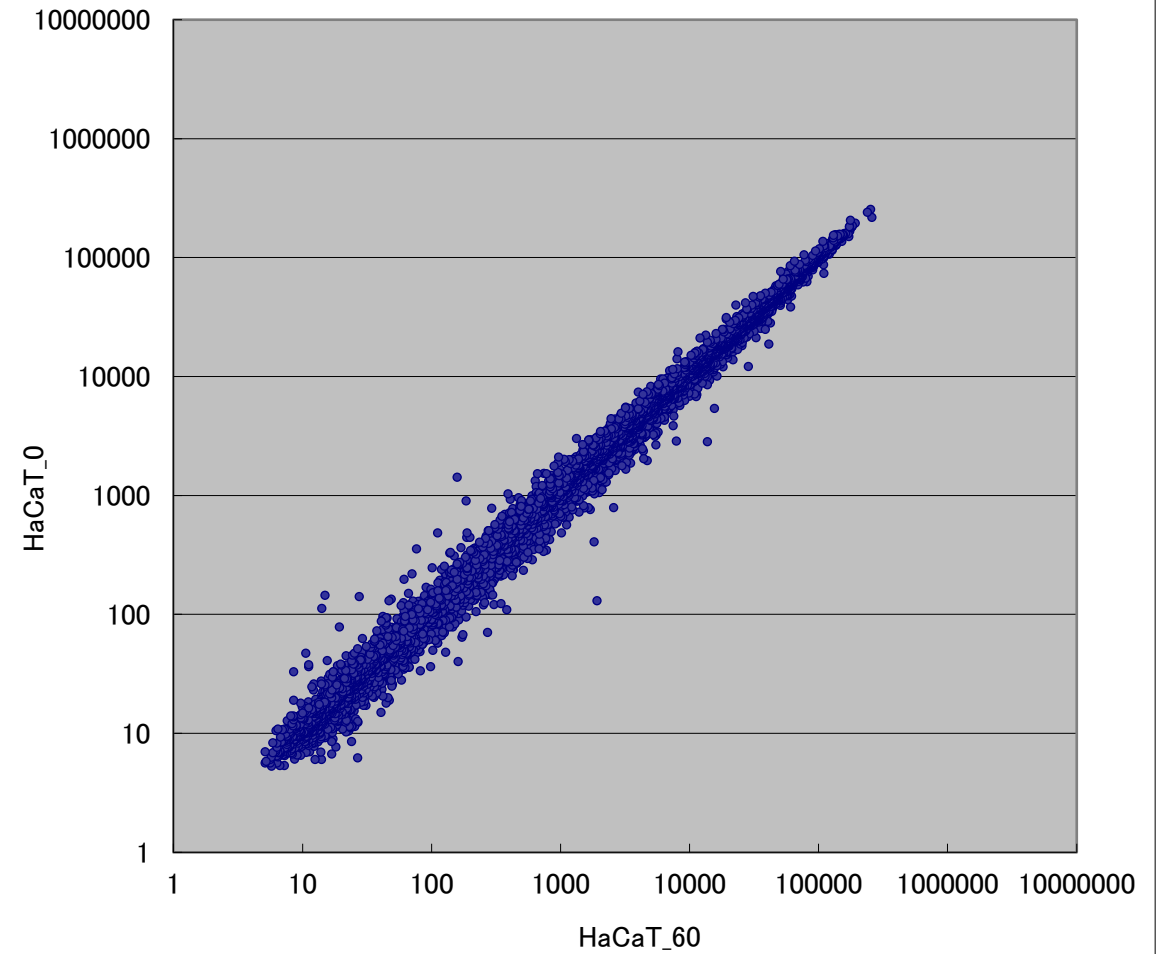
バリデーション実験
を設計するための
シーケンス情報の
取得

Scatter plots of translantome with vs without laser irradiation

0 min vs 30 min

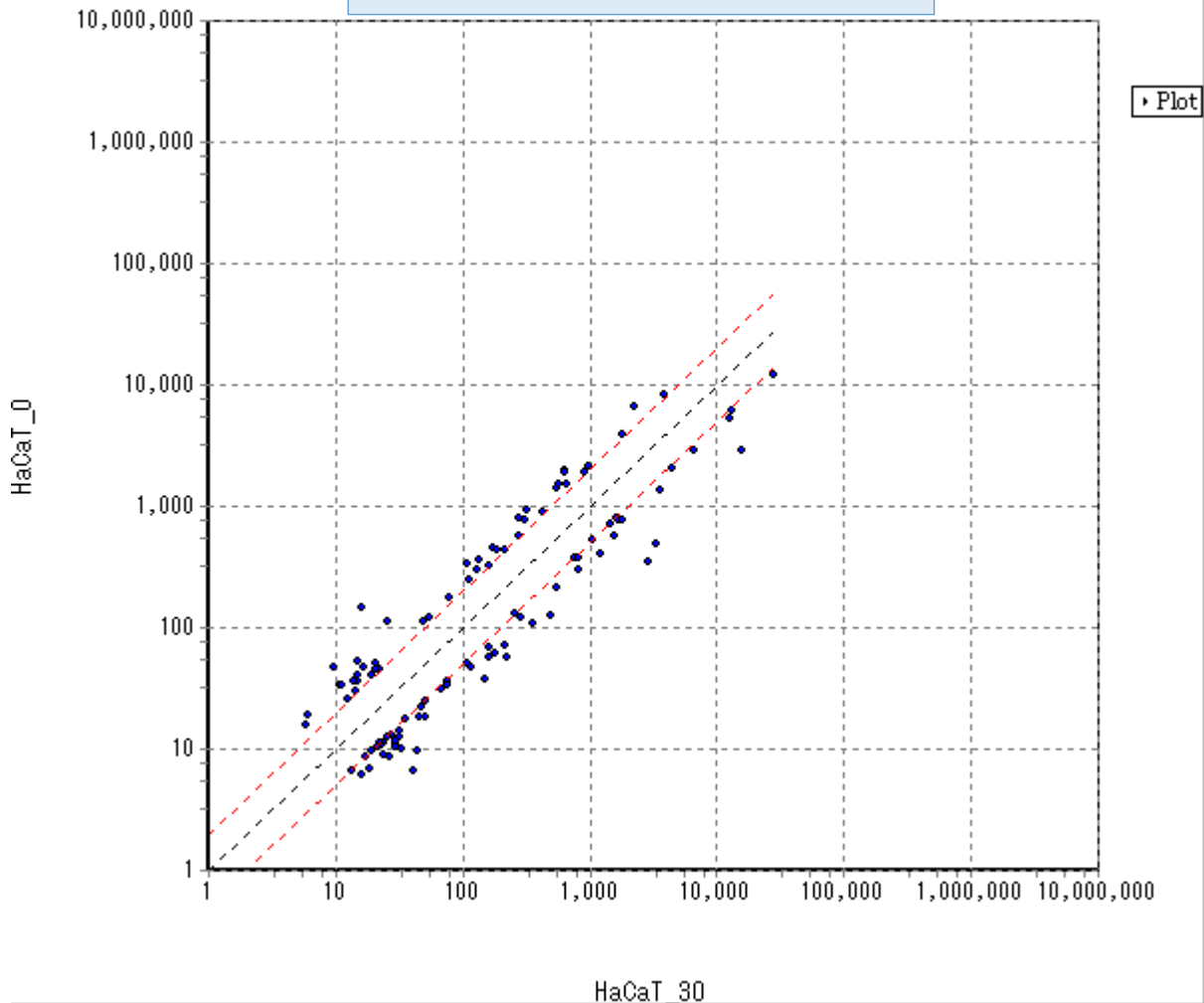


0 min vs 60 min

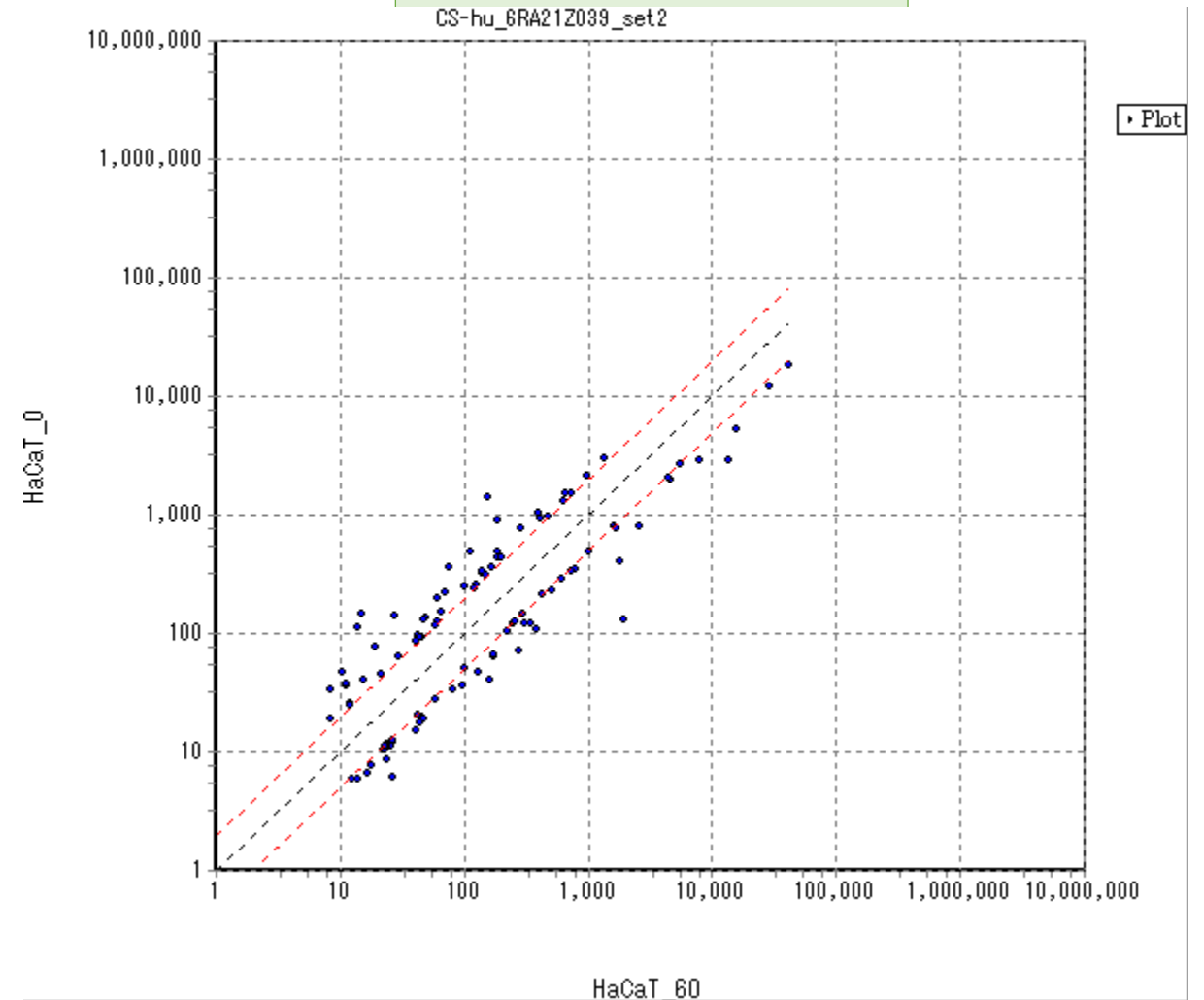


Scatter plots of translatome with vs without laser irradiation up or down regulated genes

0 min vs 30 min



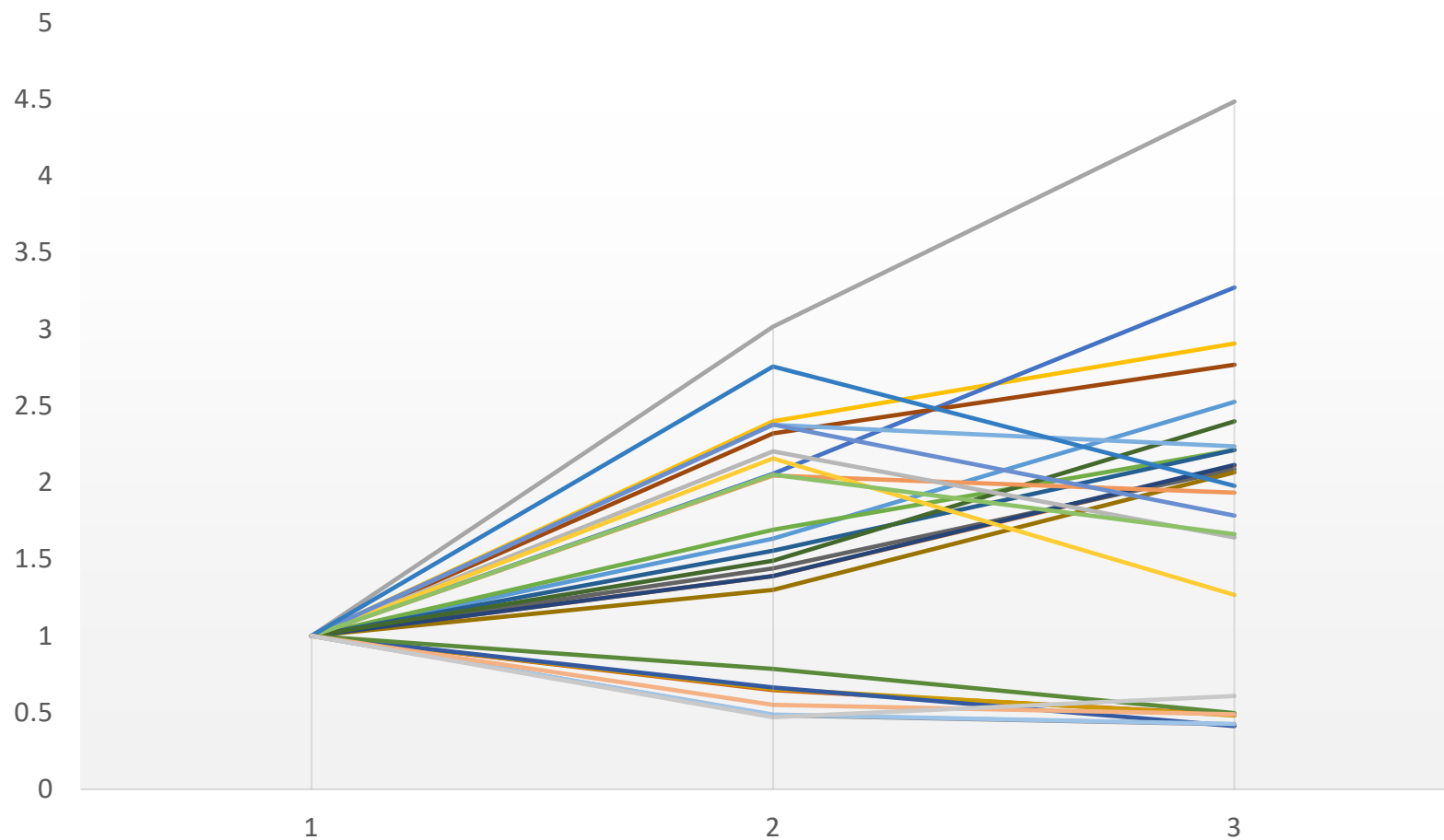
0 min vs 60 min



| 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 | LGALS1 | 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 | aminolevulinic acid 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 |

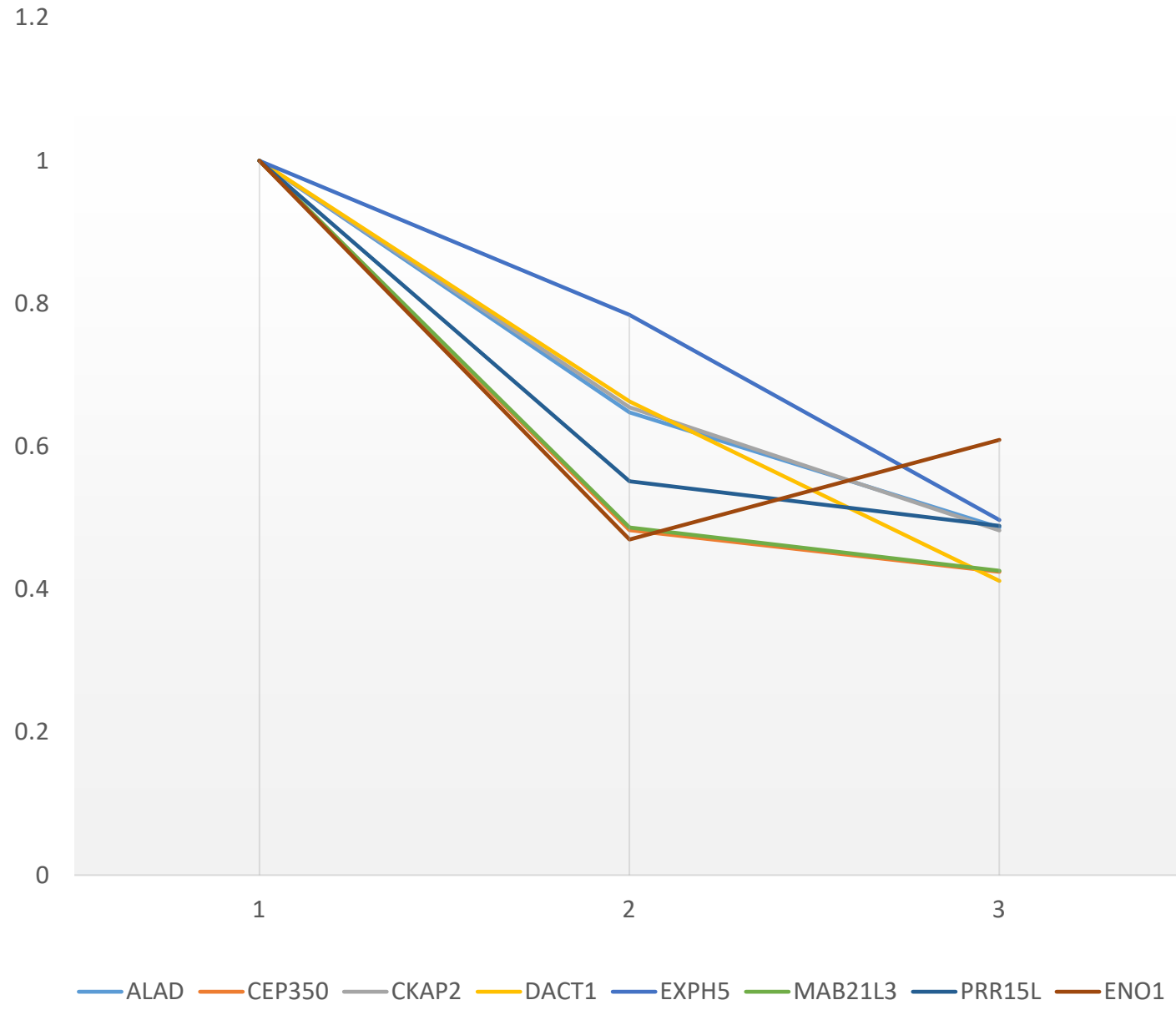
Up & Down Regulated Genes



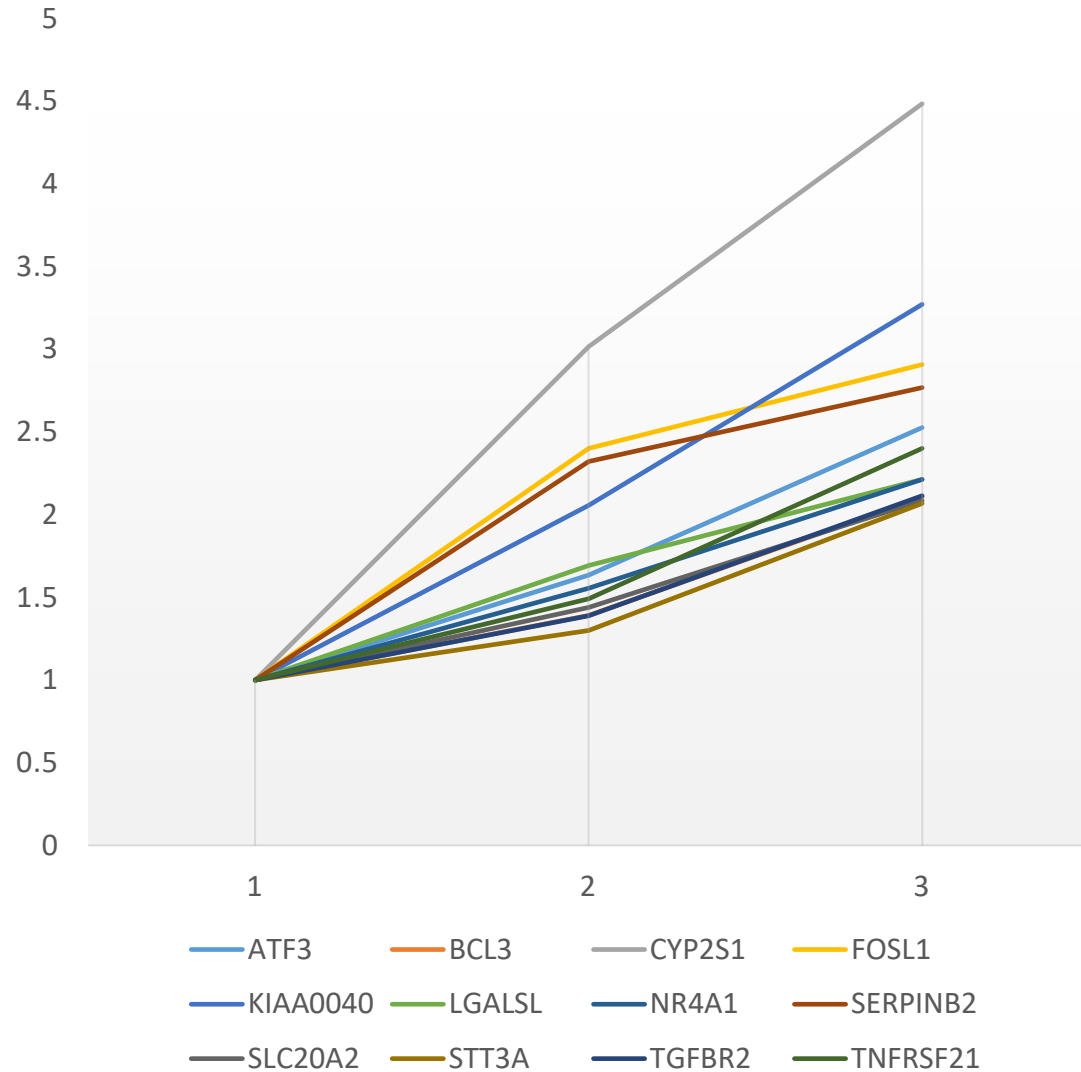
- | | | | | | |
|-----------|------------|-----------|---------|------------|------------|
| — ATF3 | — BCL3 | — CYP2S1 | — FOSL1 | — KIAA0040 | — LGALS1 |
| — NR4A1 | — SERPINB2 | — SLC20A2 | — STT3A | — TGFBR2 | — TNFRSF21 |
| — BMP4 | — CXCL8 | — DUSP4 | — DUSP6 | — HAS2 | — IL1B |
| — PHLDA1 | — ALAD | — CEP350 | — CKAP2 | — DACT1 | — EXPH5 |
| — MAB21L3 | — PRR15L | — ENO1 | | | |



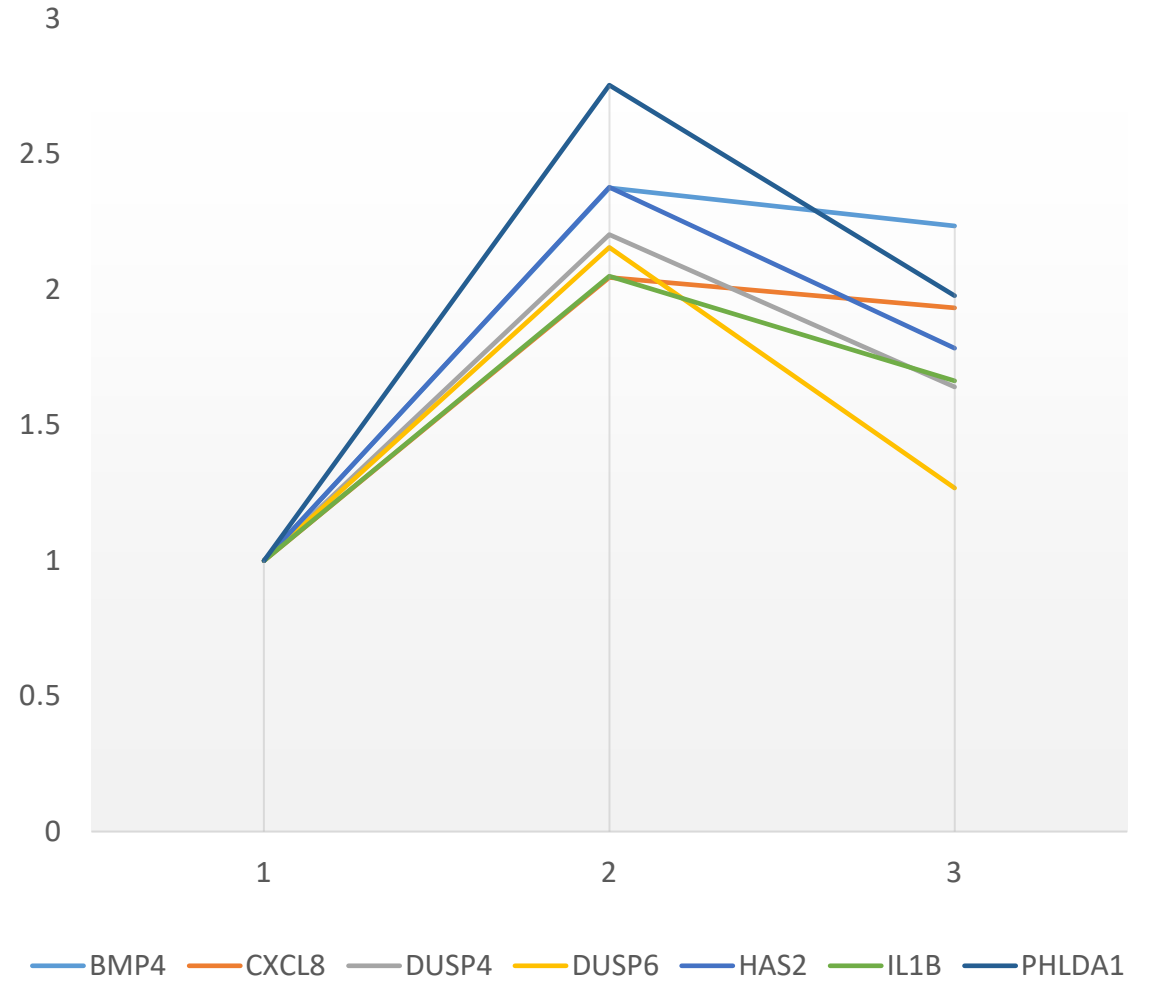
Down Regulated Genes



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細胞にレーザーの光源 (<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細胞にレーザーの光源(<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

TRPV-1, anti-TRIPV1-P

二次抗体

Alexa Fluoro[®] 594

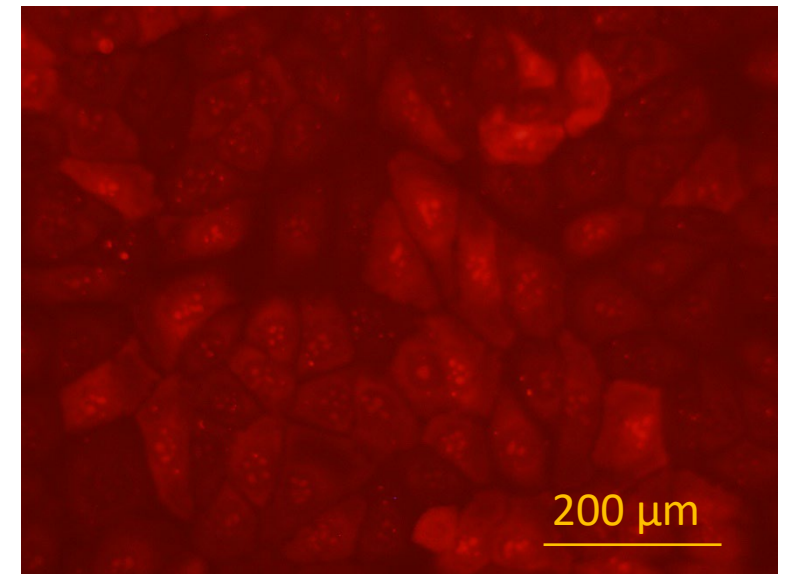
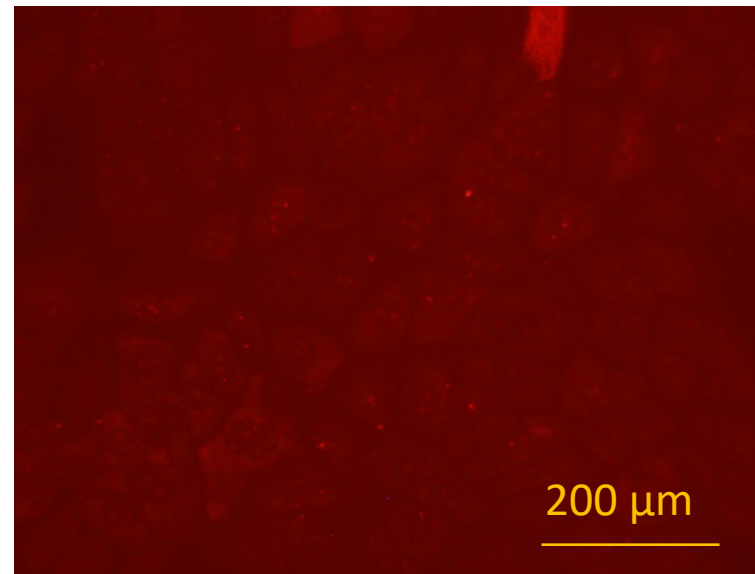
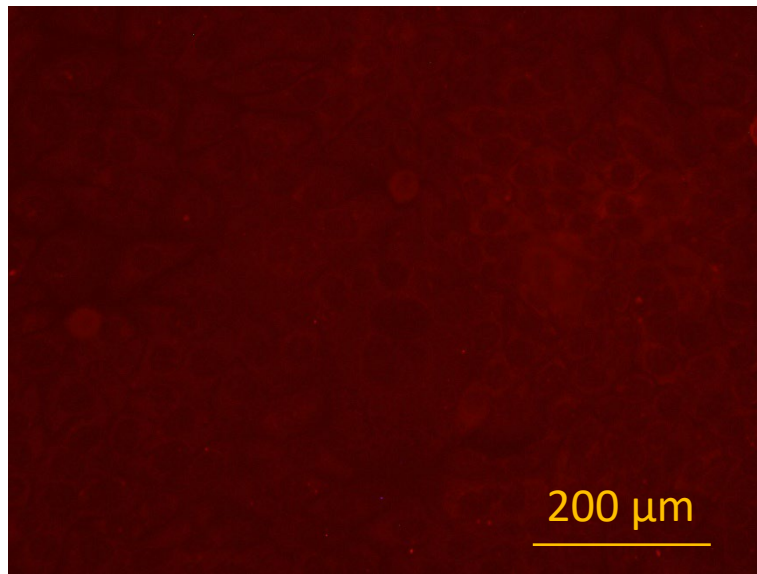


No irradiation

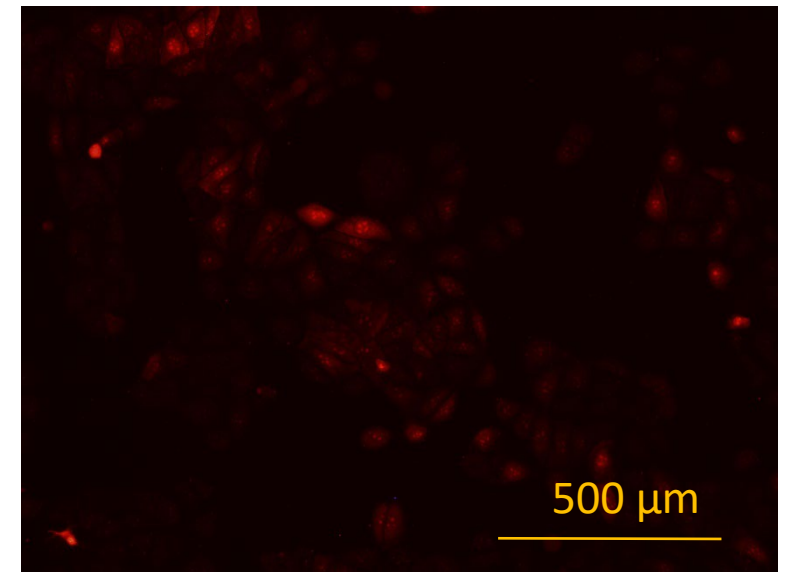
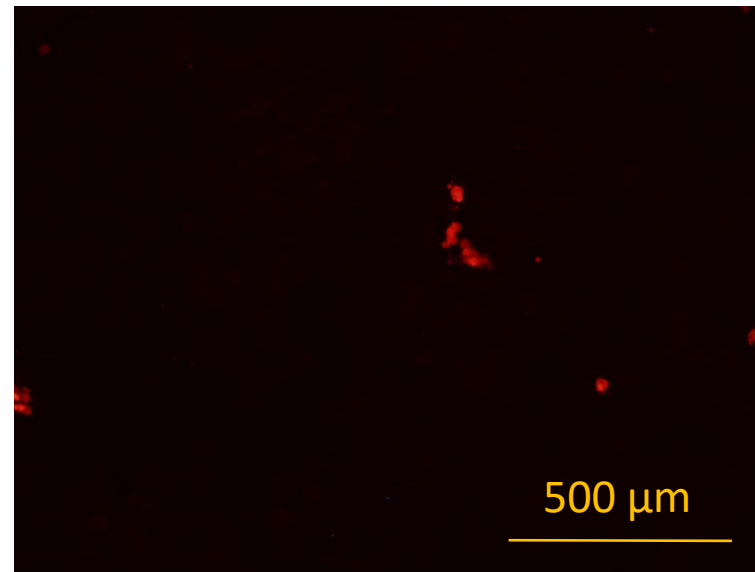
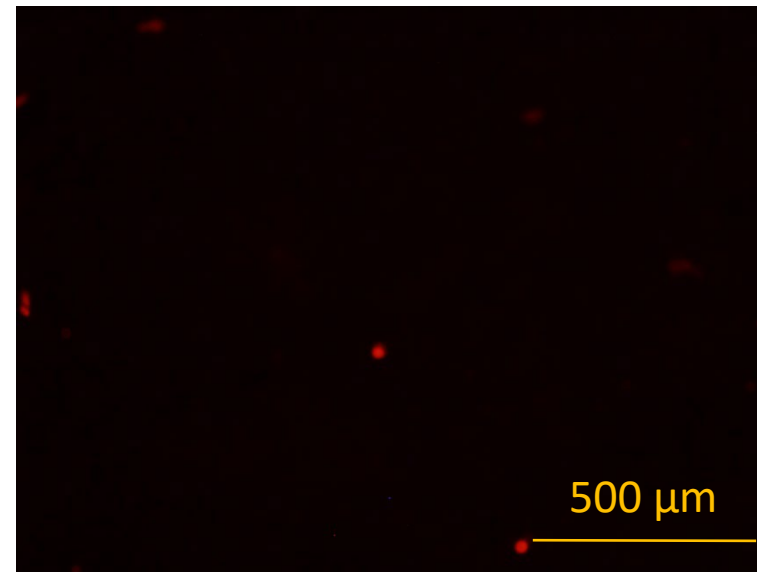
30 min irradiation

60 min irradiation

対物
X20



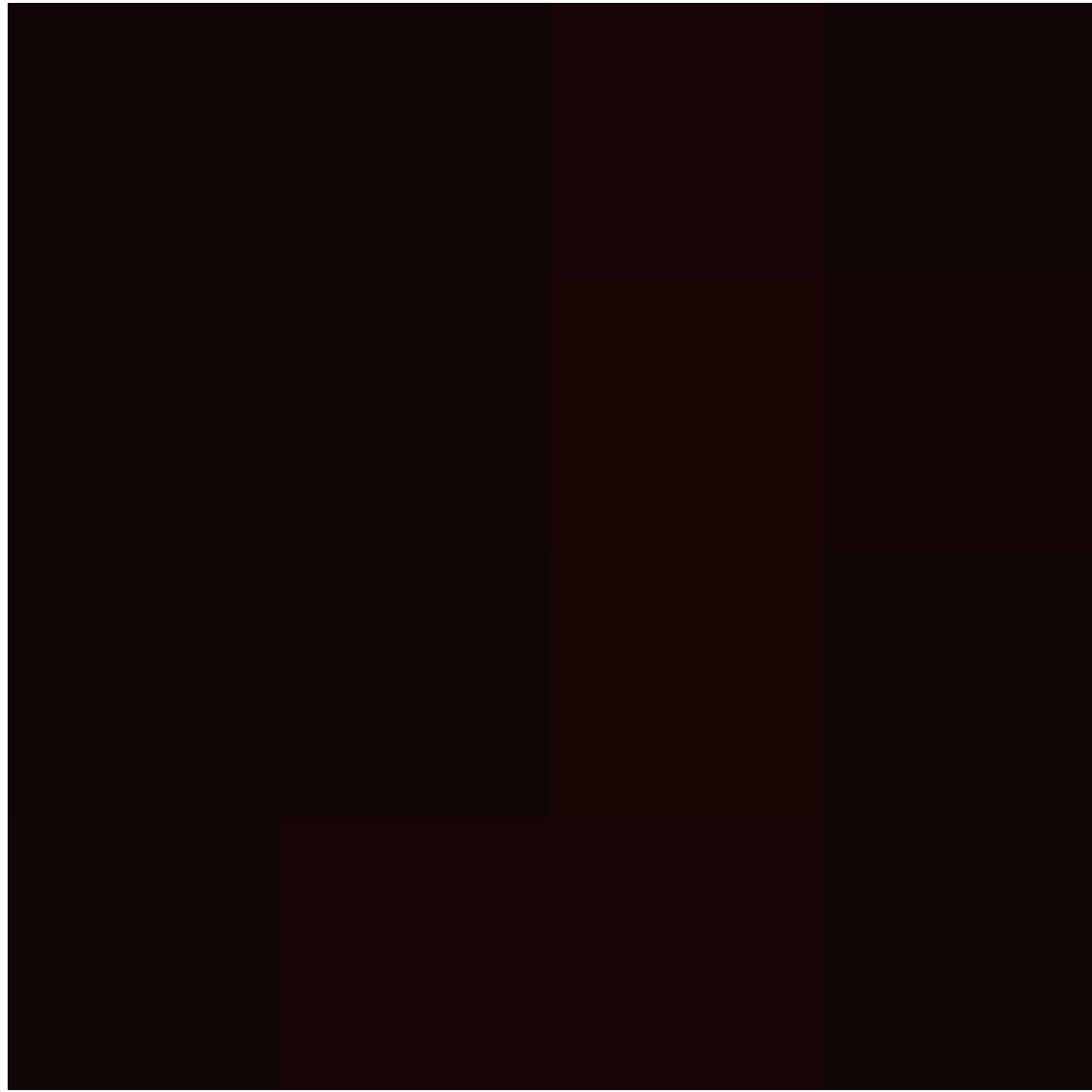
対物
X10



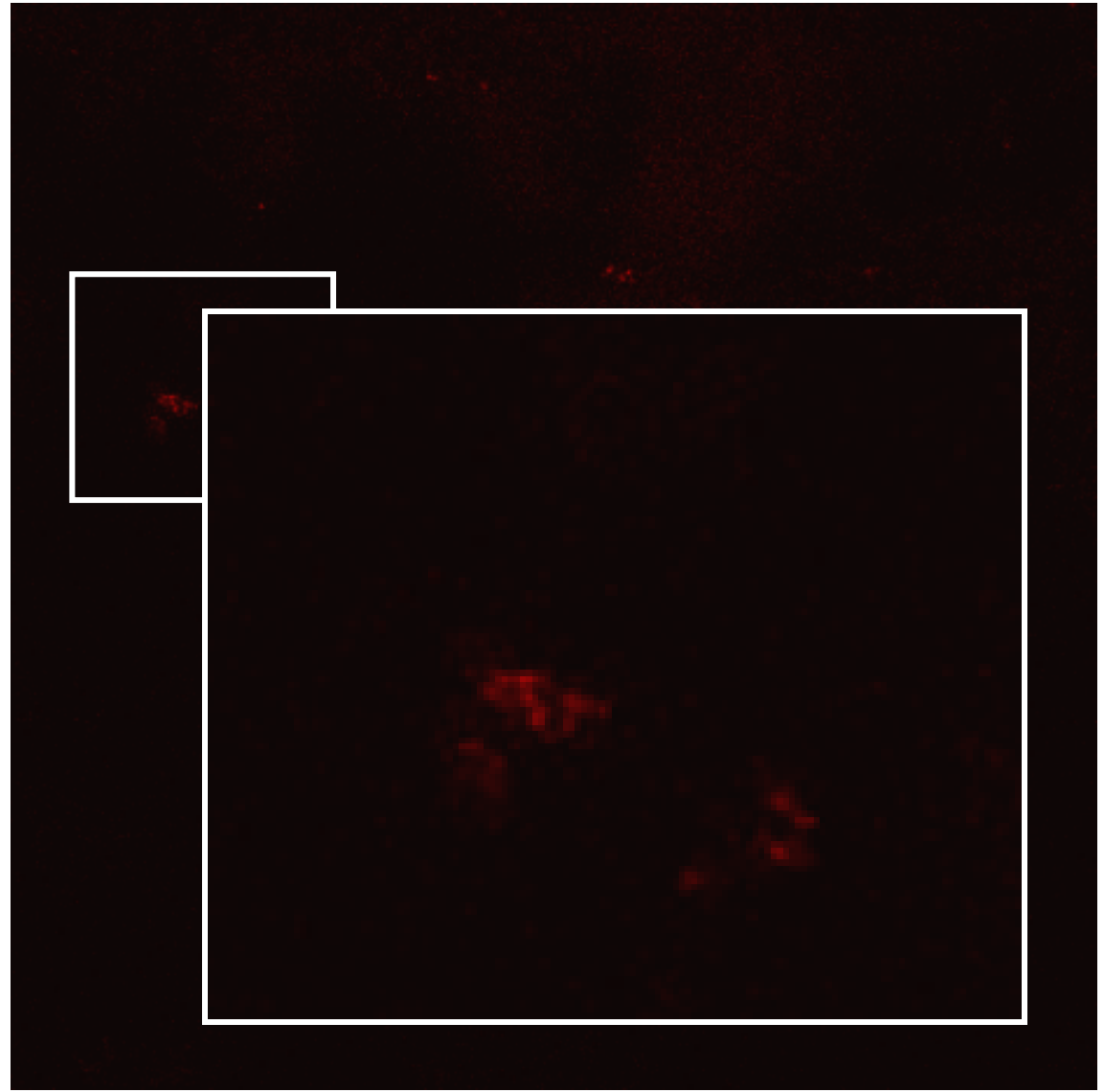
MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator



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



Irradiation 60min



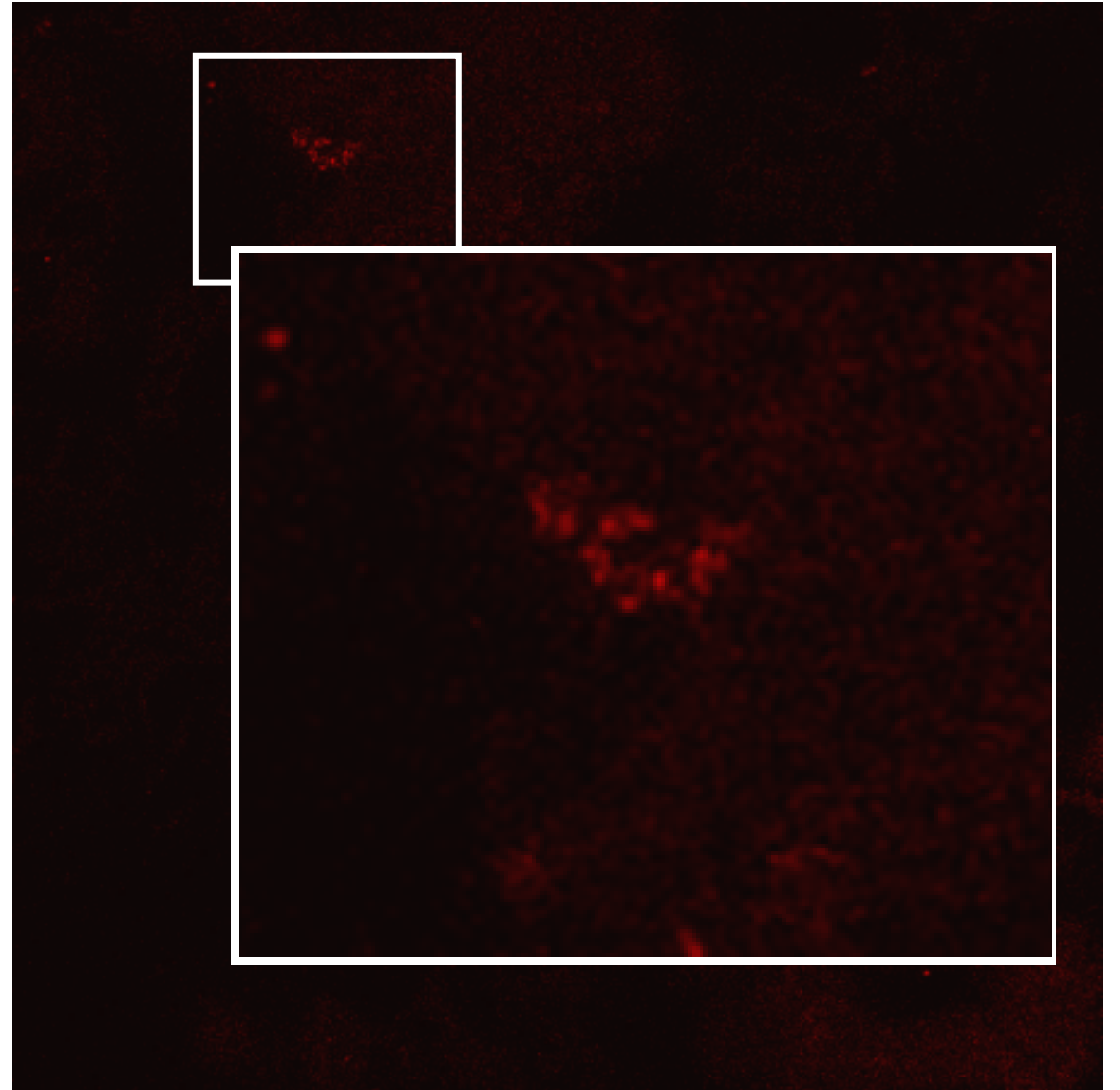


HaCaT

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。

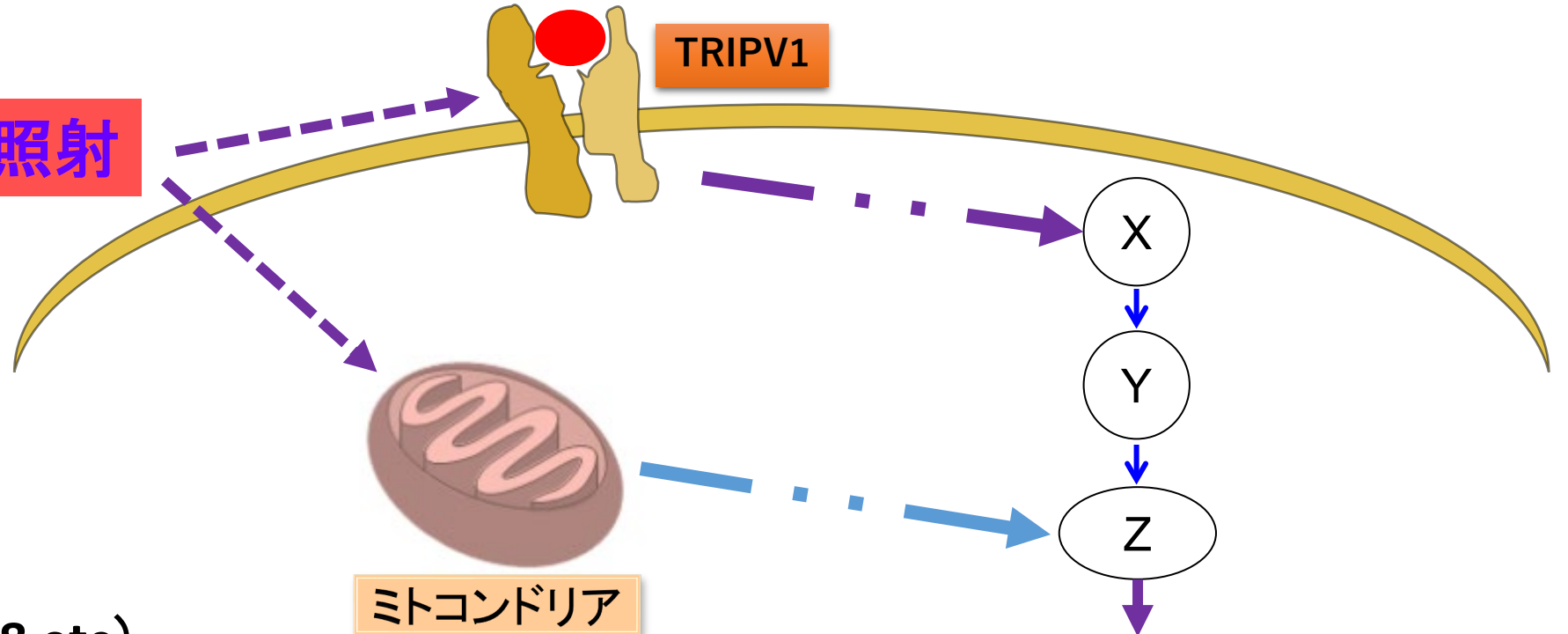


考察

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。

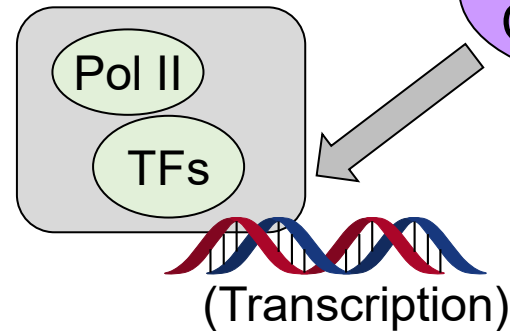
Laser655照射はATF3/CREBBPを介して遺伝子の転写を調節する?

Laser655照射



(? CYP2S1, IL1B, CXCL8 etc)

転写複合体



活性型

(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。