

平成 21年 3月 31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007年度～2008年度

課題番号：19500390

研究課題名（和文）特性遠赤外線照射時におけるATF3の役割の解析

研究課題名（英文）The analysis of role of ATF3 on far-infrared ray radiation

研究代表者 山下 菊治 (YAMASHITA KIKUJI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：30182497

研究成果の概要：研究成果の概要：遠赤外線により強く増殖が抑制される細胞に共通の遺伝子であるATF3を外陰部癌 A431、舌癌 HSC3、歯肉癌 Sa3 細胞に導入した過剰発現細胞は、増殖が抑制されることが明らかになり、細胞の膨潤変化も認められた。また、siRNA 法を用いて作製されたATF3遺伝子抑制舌癌 HSC3 細胞は、遠赤外線による増殖抑制効果が軽減された。この発見により、遠赤外線効果をもたらす薬剤の開発や臨床応用が可能になるものと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：医用光；熱工学；遠赤外線；癌；ATF3

1. 研究開始当初の背景

特性遠赤外線 CO₂ インキュベーター (37 ± 0.5℃) 及び動物飼育装置 (25～27℃) を開発して、ヒトの舌癌 HSC3 細胞、歯肉癌 Sa3 細胞、外陰部癌 A431 細胞に対する遠赤外線の影響について研究を行った。その結果、以下に示す種々の発見を行ってきた。(1) 遠赤外線照射が舌癌 HSC3 細胞と歯肉癌 Sa3 細胞の増殖を有意に抑制した。(2) 外陰部癌 A431 細胞は遠赤外線により増殖は抑制されず感受性に差があることを見いだした。(3) 舌癌 HSC3 細胞の遠赤外線による増殖抑制効果は細胞周期の遅延により引き起こされ

た。(4) 歯肉癌 Sa3 細胞の遠赤外線による増殖抑制効果は細胞周期の遅延と細胞壊死により引き起こされた。しかし、未だ遠赤外線照射が細胞の中でどのような機構で作用しているかについては全く知られていない。

2. 研究の目的

癌細胞に対する遠赤外線的作用機構を解明するために、遠赤外線照射に反応して発現する遺伝子を見だし、その役割を明らかにする。

3. 研究の方法

舌癌 HSC3 細胞、歯肉癌 Sa3 細胞、外陰部癌 A431 細胞に加えて、肺癌 A549 細胞、乳癌 MCF7 細胞を通常に従って培養し、培養細胞に対する遠赤外線の影響を以下の研究方法により解析した。(1) 遠赤外線照射が 5 種類の癌細胞の増殖に及ぼす影響について、血球計数板を用いた細胞数計数法と BrdU 取り込み法を用いて解析した。(2) 遠赤外線照射が細胞のアポトーシスおよびネクローシスを誘導するか否かについて、プロピオディウムイオダイド(PI)と Annexin-V FITC の二重染色を行い、フローサイトメーターにて解析を行った。また、TUNEL 染色を行ってアポトーシスの確認を行った。(3) 培養細胞の形態に及ぼす遠赤外線の影響について、カバーガラス上で培養した細胞を固定脱水後 HE 染色し、光学顕微鏡にて観察した。(4) 遺伝子の発現解析には、培養細胞のトータル RNA を抽出してアジレント社製のオリゴマイクロアレイスライドを用いて、増幅し、ハイブリダイゼーションを行って、ジーンプリンティングソフトにて解析を行った。(5) マイクロアレイ解析にて突き止められた遠赤外線反応細胞に共通の遺伝子である ATF3 の遺伝子をリポフェクタミン 2000 を用いて外陰部癌 A431、舌癌 HSC3、歯肉癌 Sa3 細胞に導入した過剰発現細胞を作製し、血球計数板を用いた細胞数計数法と BrdU 取り込み法を用いて細胞増殖への影響を明らかにした。(6) siRNA 法を用いて ATF3 遺伝子抑制舌癌 HSC3 細胞を作製し、遠赤外線照射が癌細胞の増殖に与える影響を解析した。

4. 研究成果

遠赤外線照射が舌癌 HSC3 細胞、歯肉癌 Sa3 細胞、外陰部癌 A431 細胞、肺癌 A549 細胞、乳癌 MCF7 細胞の増殖に与える影響について解析した結果、肺癌 A549 細胞、舌癌 HSC3 細胞、歯肉癌 Sa3 細胞では、6 日目からそれぞれ 59.0%, 75.4%, 76.2% 抑制され、少なくとも 10 日まで続いた。一方、外陰部癌 A431 細胞、乳癌 MCF7 細胞ではほとんど影響がなかった。このことは特定の癌細胞だけが遠赤外線に反応して増殖が抑制されることを示し、細胞に遠赤外線に対する感受性の違いがあることを証明している。(図 1) BrdU 取り込み法を用いた解析においても同様の結果が得られた。次にこの増殖抑制効果が細胞死に関与するか否かを明らかにするために、舌癌 HSC3 細胞、歯肉癌 Sa3 細胞、外陰部癌 A431 細胞について、フローサイトメーターによる解析及び組織学的観察を行った。その結果、遠赤外線照射により生細胞数及びアポトーシス細胞数に変化は認められなかった。しかし、唯一歯肉癌 Sa3 細胞のみネクローシス細胞数がわずかに増加した。以上の結果から、遠赤外線照射は舌癌 HSC3 細胞、外陰部

癌 A431 細胞、及び歯肉癌 Sa3 細胞に対して、アポトーシスは誘導せず、舌癌 HSC3 細胞及び外陰部癌 A431 細胞に対してはネクローシスも誘導しない。しかし、歯肉癌 Sa3 細胞に対してはわずかにネクローシスを誘導することが、明らかになった。このことは舌癌 HSC3 細胞の増殖抑制にはネクローシスの誘導は関与しないが、歯肉癌 Sa3 細胞の増殖抑制効果はネクローシスの誘導によって引き起こされることを示唆している。しかし、その誘導率は低く、増殖抑制効果に占めるネクローシスの関与は補助的なものと考えられる。また、遠赤外線照射によるアポトーシスの誘導に関しては TUNEL 法を用いても確認された。その結果、

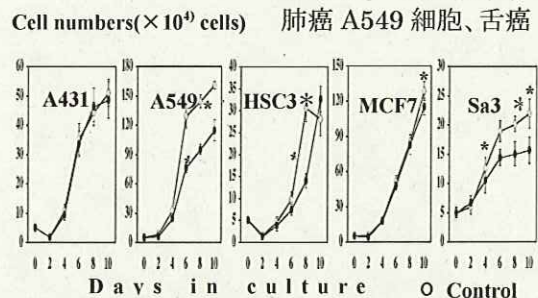
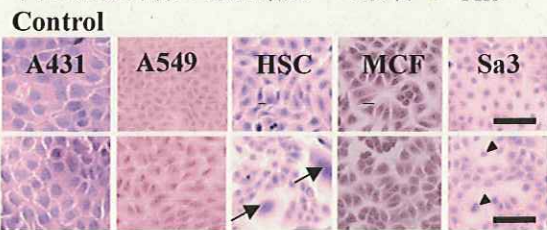


図 1 遠赤外線の細胞増殖への影響 ● FIR



FIR

図 2 遠赤外線の形態変化に及ぼす役割

HSC3 細胞、乳癌 MCF7 細胞及び歯肉癌 Sa3 細胞について遠赤外線照射にてアポトーシス細胞の誘導は全く検出されなかったが、遠赤外線照射により増殖抑制効果が認められなかった外陰部癌 A431 細胞にてわずかにアポトーシス細胞が検出された。この結果は、遠赤外線照射による癌細胞の増殖抑制効果はアポトーシスの誘導により引き起こされるものではないことを示している。更に、遠赤外線照射による細胞の形態変化を図 2 に示した。その結果、遠赤外線照射によって細胞増殖が強く抑制された舌癌 HSC3 細胞、及び歯肉癌 Sa3 細胞では明らかに肥大化した細胞が観察され、更にやはり増殖が強く抑制された肺癌 A549 細胞ではすべての細胞が肥大化する事が明らかになった。しかし、遠赤外線照射では増殖に影響を受けなかった外陰部癌 A431 細胞と乳癌 MCF7 細胞は、ほとんど形態の変化を示さなかった。

そこで、遠赤外線照射によって増殖が強く抑制された舌癌 HSC3 細胞、歯肉癌 Sa3 細胞、肺癌細胞 A549 細胞が遠赤外線照射に反

応して発現が増強される共通遺伝子で、増殖抑制効果をあまり示さなかった外陰部癌 A431 細胞と乳癌 MCF7 細胞では発現が認められなかった遺伝子を解析した結果、ATF3 のみが検出された。このことは遠赤外線照射に反応して発現する遺伝子が ATF3 であることを示唆している。そこで、外陰部癌 A431、舌癌 HSC3、歯肉癌 Sa3 細胞の ATF3 の過剰発現細胞を作製して増殖能を評価した。

作製した遺伝子過剰発現細胞は有意に ATF3 の遺伝子発現が促進されていた。(図 3) 更に、これらの遺伝子過剰発現細胞の増殖変化を解析すると、舌癌 HSC3 細胞、歯肉癌 Sa3 細胞、肺癌 A549 細胞の ATF3 過剰発現細胞は増殖が抑制されることが明らかになった。(図 4) しかも、これらの過剰発現細胞の形態変化を観察した結果、遠赤外線照射により増殖が強く抑制されている舌癌 HSC3 細胞と歯肉癌 Sa3 細胞では遠赤外線照射によって誘導された肥大化細胞が検出された。

(図 5) この結果から、ATF3 過剰発現細胞は遠赤外線照射によって誘導された細胞の変化と同様の変化を示すことが明らかになった。

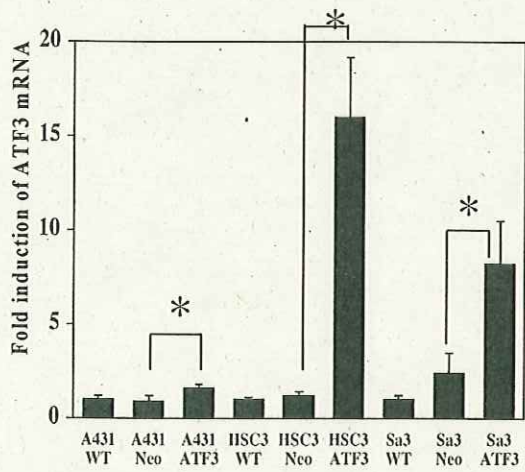


図 3 ATF3 過剰発現細胞の遺伝子発現率

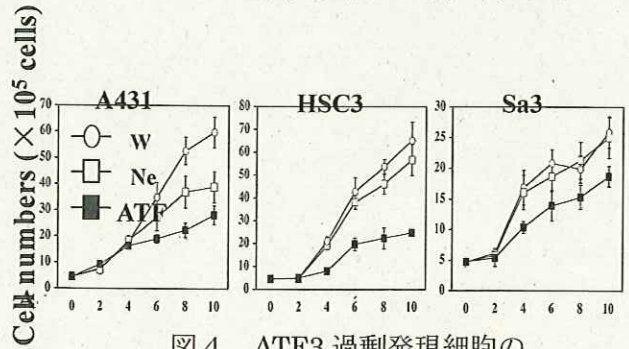


図 4 ATF3 過剰発現細胞の

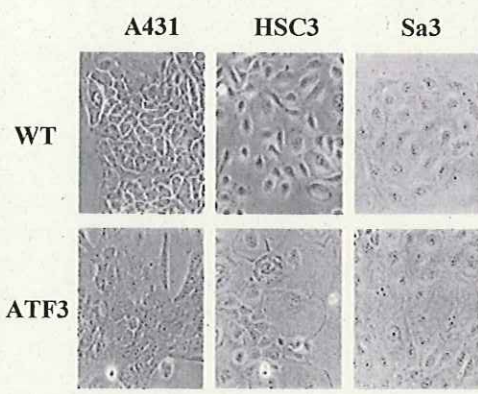


図 5 ATF3 過剰発現細胞の形態変化

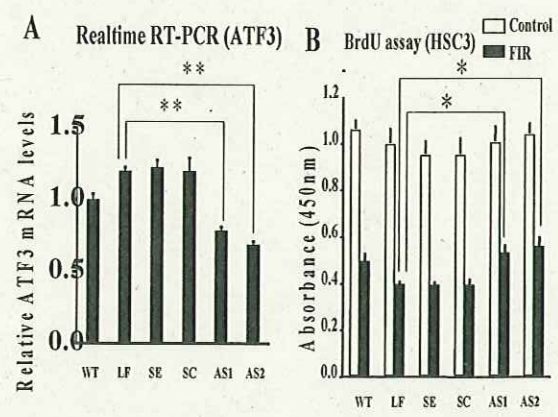


図 6 ATF3 発現抑制細胞の ATF3 遺伝子発現量と細胞増殖への影響

さらに、HSC3 遺伝子の siRNA を用いて ATF3 発現抑制細胞を作製し、その遺伝子の発現量を解析すると、有意に ATF3 遺伝子の発現が抑制された事が明らかになった。また、この HSC3 細胞の ATF3 発現抑制細胞では、遠赤外線照射によって誘導される増殖抑制効果が軽減された。(図 6) 以上の結果から、ATF3 は遠赤外線照射により特異的に発現し、その作用により細胞増殖が抑制され、壊死が誘導される事が明らかになった。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Ishibashi J, Yamashita K, Ishikawa H, et al. The effects inhibiting the proliferation of cancer cells by far-infrared radiation (FIR) are controlled by the basal expression level of heat shock protein

(HSP) 70A. Medical Oncology, 25(2),
229-237 (2008). 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① Kikuji Yamashita, Possibility of far-infrared ray as physical therapy for cancer. The 1st International Mini Symposium on Wave Biotechnology, March 25th, 2009, Dongguk Univ. (Seoul)

山下菊治, がんに効果が期待される物理療法, 第4回日本腫瘍学会学術集会, 平成20年 7月13日日本教育会館(東京)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 2 件)

- ① 遠赤外線を放射する癌治療器具, 発明者 山下菊治, 特許、特開 2006-055540, 平成16年8月23日
- ② インキュベータおよび細胞培養装置, 発明者 山下菊治, 特許、特開 2004-305137, 平成15年4月9日

○ 取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 菊治 (YAMASHITA KIKUJI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号 30182497