

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008年度～2010年度
 課題番号：20500476
 研究課題名（和文） 培養細胞を用いた温熱療法の最適有効量の決定と効果発現機序の解明
 研究課題名（英文） Determination of optimal thermotherapy and study of the mechanisms underlying the effect of heat shock in cultured cells
 研究代表者
 平上 二九三（HIRAGAMI FUKUMI）
 吉備国際大学・保健科学部・教授
 研究者番号：60278976

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、温熱療法の細胞学的根拠を明らかにすることである。そのために我々は、正常ヒト線維芽細胞の平面絹媒体三次元様増殖のための最適温熱量とそれを引き起こす細胞内シグナル伝達経路について研究を行った。その結果、我々は43℃で10分間の温熱刺激を与えると三次元様増殖が起こることを観察し、その時同じ温熱条件によってp38 MAPKとHsp27経路が働いて三次元様増殖に寄与していることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to elucidate the cellular mechanisms underlying the therapeutic effects of heat. To that end, we studied the optimal heat conditions for enhancement of pressed silk-mediated 3D-like proliferation of normal human dermal fibroblasts as well as the responses to heat shock of cells and intracellular signaling pathways. We observed changes in the 3D-like proliferation pattern induced by heat treatment at 43°C for 10 min and found that activation of p38 MAPK and Hsp27 by the same heat treatment is associated with 3D-like cell proliferation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：正常ヒト線維芽細胞、温熱刺激、三次元様増殖

1. 研究開始当初の背景

リハビリテーション（以下、リハ）医学は、障害のある身体に外部刺激を与え、生体が本来備えている自然治癒力を促し機能回復を促進するものである。一般に適度な外部刺激は、身体機能の維持向上を図るものの、弱い刺激では効果はなく、強すぎる刺激は逆に機能障害をきたすことが知られている。身体機能回復を促進する適度な刺激量は、細胞自身の生理的活性を高めると考えられ、細胞機能を高進するような適用量を踏まえておくこ

とは重要である。障害の機能回復に有効な治療量は、細胞の損傷と修復といった回復メカニズムの解明からも示されるべきである。特に最近のリハ医療には、エビデンスに基づいた治療や効果判定が問われ、さらに質に加えて効率性が求められていることから基礎研究の成果が待たれている。例えば、温熱療法の治療効果の高い適用量を定めるために分子生物学的な研究成果の期待もその一つである。

2. 研究の目的

細胞培養の基礎研究では、薬剤などの化学物質の作用について、その最適有効量を調べた研究は数多いが、リハ医療で用いる物理刺激や運動刺激などの効果を調べた実験は少ない。また、理学療法で用いる様々な治療法の効果は、細胞レベルで検証することが望まれるなかで、温熱療法の設定温度や治療時間および頻度などといった適用量については、あいまいで直接証明したものは乏しく、細胞機能を促進する最適有効量について調べた研究はあまりみられない。本研究では、細胞生物学的に温熱治療効果の高い最適有効量を決定し、その効果発現機序を分子生物学的に解析し、臨床応用につながる知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 正常ヒト細胞と平面絹の混合培養による温熱処理後の三次元様増殖形成率

これまでの研究でマウス線維芽細胞と担体(ハイドロキシアパタイト, HA)を用い、三次元様増殖の形成を指標として温熱療法の最適条件を検討してきた。三次元様増殖とは通常、フラスコ内において正常線維芽細胞は単層で増殖するが、温熱処理後、担体の全周を囲んだ細胞が重層し、立体的に増殖したものを指す。本研究では、マウス線維芽細胞を正常ヒト細胞に代え、また HA を平面絹に代えて実験を行った。

本実験に用いた細胞は、新生児の純粋な皮膚線維芽細胞として分離された初代培養細胞である。また、細胞の担体としては、結合組織を再構築するために開発された平面絹を用いた。フラスコ内に、一定量の増殖期の正常ヒト線維芽細胞を播き、平面絹を100枚加えて混合培養した。温熱刺激は、温水槽を用い、適用温度を37(コントロール)・40・43・45°C、処理時間は10分間とした。温熱処理後は、正常ヒト細胞をCO₂インキュベーター内で静置培養した。細胞は、温熱処理1週間から経時的に倒立型位相差顕微鏡を用いて観察した。

(2) ヒト線維芽細胞における温熱刺激による p38 MAPK と Hsp27 の活性化

これまでの研究から、温熱刺激による三次元様増殖には p38 MAPK が重要な働きを担っていることを突き止めてきた。本研究では、p38 MAPK のシグナル伝達を介して Hsp70 や Hsp27 などの熱ショック蛋白質群がたくみに運動して働き、アポトーシスを防御すると共に、コラーゲン産生による細胞外マトリックスが合成され、細胞移動により重層した三次元様構造が作られたものと仮説を立てた。

そこで、培養細胞に温熱刺激を与え、温熱反応とそれに関わるシグナル伝達系として

p38 MAPK キナーゼ経路に焦点をあて、p38 の下流にある転写因子である Hsp70 や Hsp27 などの働きについて調べる実験を行った。ヒト線維芽細胞に 37, 40, 43, 45°C で各 10 分間の温熱刺激を与えた直後と 1 時間後および 6 時間後のリン酸化 p38 タンパク質の発現量およびリン酸化 Hsp27 タンパク質発現量の経時的变化を調べた。

4. 研究成果

(1) 三次元様増殖の形成率を指標とした温熱療法の最適有効量の決定

正常ヒト細胞と平面絹の混合培養し 37・40・43・45°C で各 10 分間の温熱刺激を与え三次元様増殖の形成過程を 10 週間観察した結果、温熱処理後 2 週間目の三次元様増殖の出来かけの割合が、温熱効果を敏感に反映していた(図 1)。出来かけの割合は 40°C 10 分間群が非処理対照群の 3.2 倍、43°C 10 分間群は 8.6 倍と高率となった(図 2)。

この結果は、短時間の温熱刺激でも細胞が変化するということを認めているので、理学療法で行われている短時間の温熱療法の効果と一致する。このことから本研究は、温熱療法の最適有効量を決定するための基礎となり、温熱療法の効果判定を細胞生物学的に示すための重要な知見になると考えられる。

(2) 細胞内シグナル伝達系からみた温熱療法の効果発現機序の解明

最適有効量であった 43°C 10 分の温熱刺激は、p38 MAPK 経路を介して三次元様増殖に働き、p38 MAPK タンパク質とその下流の Hsp27 タンパク質が活性化(リン酸化)していることを実験で確かめた。

その結果、リン酸化 p38 タンパク質の発現量は、43°C 10 分間処理直後では明らかに増加するものの、徐々に減少し 6 時間後では 37°C コントロールレベルまで低下した(図 3)。また、リン酸化 Hsp27 タンパク質の発現量は、45°C 10 分間処理において 1 時間後をピークに直後より増加を示し、6 時間後に低下した(図 4)。

これらの結果から温熱療法における細胞レベルの即時的な効果発現機序は、p38 MAPK キナーゼ経路を介することが示唆された。本研究結果は、温熱療法の効果判定を分子生物学的に示すための重要な知見になると考えられ、今後、温熱治療効果の検証を細胞生物学的に決定することで臨床応用につなげたいと考えている。

(3) 今後の展望

p38 MAPK タンパク質は、43°C 10 分・45°C 10 分間のどちらでもほぼ同じ活性化を示しており、43°C 10 分では細胞の増殖活性に働くが、45°C 10 分間では細胞毒性から細胞を保護するために Hsp27 が活性化したことが明らかになった。

今回の実験で正常ヒト細胞の三次元様増殖の適用量の決定とメカニズムの解明が進めば、骨折治療や創傷治癒および褥瘡治療などの組織欠損部の修復の促進に関する新しい知見が得られるかもしれない。

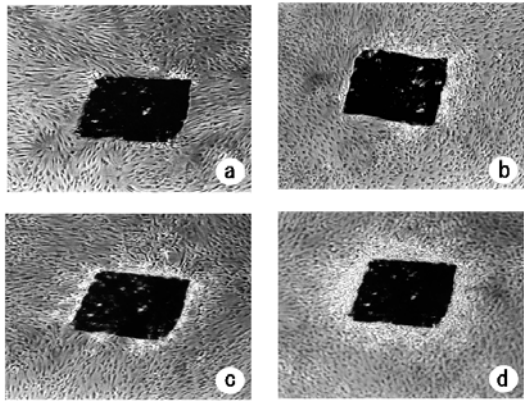


図1 平面絹を担体とした正常ヒト線維芽細胞の三次元様増殖の形成

三次元様増殖の形成過程には、温熱処理1週間後から観察される平面絹の『a:きざし』、2週間後から観察される半周以上、3/4未満を『b:できかけ』、ほぼ全周(3/4以上・一部欠損がある)を『c:ほぼ形成』、完全に囲んで重層したものを『d:形成』とする4段階が見出された。

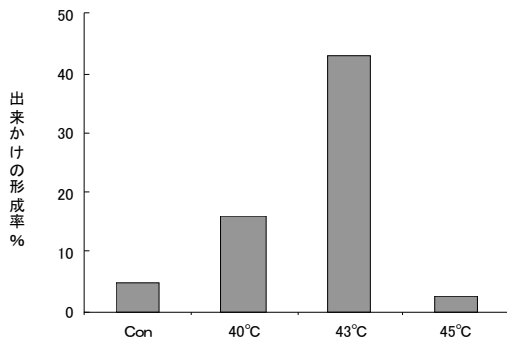


図2 40, 43, 45°C10分間の温熱処理による三次元様増殖の出来かけの形成率

平面絹と正常ヒト線維芽細胞の混合培養における37・40・43・45°Cでの温熱刺激後2週間後目の「できかけ」の割合は、それぞれ5.0%、15.8%、43.0%、2.5%であった。

あるいは、物理療法や運動療法などのリハビリ治療に関する有効な適用量を細胞レベルで提示できる可能性を秘めているとも考えられる。ひいてはリハ効果の判定を細胞レベルのみならず、遺伝子レベル・分子レベルで決定するための糸口になると期待される。

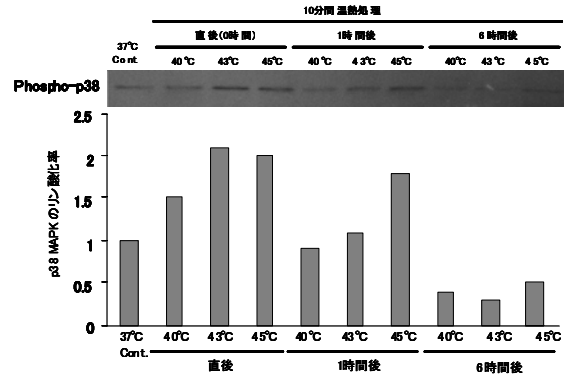


図3 熱ショックによる正常ヒト線維芽細胞の p38 MAPK キナーゼの活性化

図は各温熱処理10分間を行った直後、1時間後および6時間後のリン酸化p38タンパク質の発現量を示したものである。43°C 10分間処理では、直後にリン酸化p38タンパク質の発現量は37°Cコントロールに比べ、約2倍に増加し、6時間後にはコントロールレベルまで低下した。また45°C 10分間処理でも同様の傾向を示した。リン酸化p38タンパク質の発現量は43・45°C 10分間処理において、直後にピークに達し37°Cコントロールに比べ約2倍の増加を示すものの、6時間後には37°Cコントロールレベルに低下した。

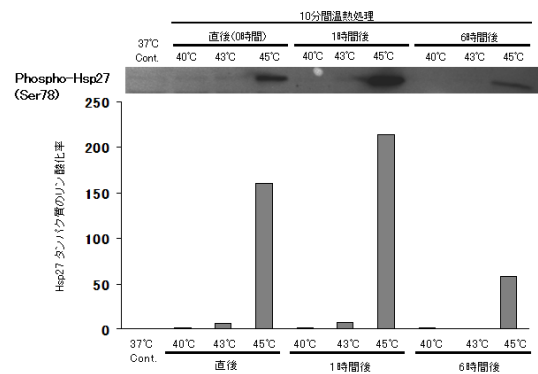


図4 熱ショックによる正常ヒト線維芽細胞の Hsp27 の活性化

図は78リン酸化Hsp27タンパク質の発現量について経時的変化を示したものである。45°C 10分間処理において1時間後をピークに直後より78リン酸化Hsp27タンパク質の発現量は増加を示し、6時間後に低下した。また、43°C 10分間処理でも同様の傾向を示した。

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 16 件)

- ①_r 小池好久 平上二九三 加納良男 : 神経成長因子存在下で神経突起形成が見られない PC12m3 細胞における低周波振動音刺激による神経突起の誘導. 人間と科学 県立広島大学保健福祉学部誌 8, 49-56, 2008. 査読無
- ② Inoue S, Motoda H, Koike Y, Kawamura K, Hiragami F, Kano Y. : Microwave Irradiation Induces Neurite Outgrowth in PC12m3 Cells via the p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway. Neuroscience Letter 432, 302-306, 2008. 査読有
- ③ 井上茂樹 元田弘敏 若竹雄治 加納良男 平上二九三 : 正常ヒト細胞と平面絹の混合培養による三次元様増殖を指標とした温熱刺激の効果. 総合リハビリテーション 36, 791-796, 2008. 査読有
- ④ 元田弘敏 井上茂樹 若竹雄治 加納良男 平上二九三 : 温熱刺激による平面絹を媒体とした正常ヒト細胞の三次元様増殖と臨床への応用. 吉備国際大学保健福祉研究所研究紀要 9, 9-14, 2008. 査読無
- ⑤ 三宅勝久 平上二九三 河村顕治 元田弘敏 小池好久 井上茂樹 若竹雄治 加納良男 : インターフェロンによる PC12 変異細胞の神経分化誘導の解析. 吉備国際大学保健福祉研究所研究紀要 9, 45-49, 2008. 査読無
- ⑥ 加納良男 中桐佐智子 平上二九三 小池好久 三宅優紀 河村顕治 : 高浸透圧刺激による細胞内シグナル伝達機構の解析. 吉備国際大学保健科学部研究紀要 12, 85-89, 2008. 査読無
- ⑦ 平上二九三 元田弘敏 井上茂樹 若竹雄治 加納良男 : 培養細胞を用いた温熱療法の効果判定に関する研究. 吉備国際大学保健科学部研究紀要 12, 63-71, 2008. 査読無
- ⑧ Kano Y, Horie N, Doi S, Aramaki F, Maeda H, Hiragami F, Kawamura K, Motoda H, Koike Y, Akiyama J, Eguchi S, and Hashimoto K. : Artepillin C Derived from Propolis Induces Neurite Outgrowth in PC12m3 Cells via ERK and p38 MAPK Pathways. Neurochemical Research 33, 1795-803, 2008. 査読有
- ⑨ Hiragami F, Motoda H, Takezawa T, Takabayashi C, Inoue S, Wakatake Y, Kano Y. : Heat Shock-induced Three-dimensional-like Proliferation of

Normal Human Fibroblasts Mediated by Pressed Silk. International Journal of Molecular Sciences 12, 4963-4976, 2009. 査読有

- ⑩ 加納良男 平上二九三 元田弘敏 井上茂樹 友國由美子 河村顕治 : 薬剤高感受性 PC12 変異細胞を用いた抗がん剤作用機序の解析. 吉備国際大学研究紀要(保健科学部) 19, 85-90, 2009. 査読無
- ⑪ 元田弘敏 若竹雄治 井上茂樹 加納良男 平上二九三 : ラット心臓由来 H9C2 細胞株での MyoD および Myogenin mRNA 発現の解析. 吉備国際大学保健福祉研究所研究紀要 10, 23-26, 2009. 査読無
- ⑫ 若竹雄治 元田弘敏 井上茂樹 加納良男 平上二九三 : 温熱刺激による細胞損傷と機能回復の分子生物学的解析. 吉備国際大学保健福祉研究所研究紀要 10, 27-32, 2009. 査読無
- ⑬ 平上二九三 元田弘敏 若竹雄治 井上茂樹 加納良男 : ヒト線維芽細胞における温熱刺激による p38 MAPK と Hsp27 の活性化. 吉備国際大学保健福祉研究所研究紀要 12, 17-20, 2011. 査読無
- ⑭ Murai H, Hiragami F, Kawamura K, Motoda H, Koike Y, Inoue S, Kumagishi K, Ohtsuka A, Kano Y. : Differential response of heat-shock-induced p38 MAPK and JNK activity in PC12 mutant and PC12 parental cells for differentiation and apoptosis. Acta Med Okayama 64, 55-62, 2010. 査読有
- ⑮ Motoda H, Kano Y, Hiragami F, Kawamura K, Matsumoto H. : Morphological changes in the apex of pea roots during and after recovery from aluminium treatment. Plant and Soil 333, 49-58, 2010. 査読有
- ⑯ Motoda H, Kano Y, Hiragami F, Kawamura K, Matsumoto H. : Changes in rupture formation and zony region stained with Evans blue during the recovery process from aluminum toxicity in the pea root apex. Plant Signaling and Behavior 6, 98-100, 2011. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ①_r 中川昌幸 橋本直樹 元田弘敏 井上茂樹 平上二九三 : 伸展刺激が培養細胞に及ぼす影響—MyoD, Myogeninの発現パターンの解析—. 第45回 日本理学療法学会大会, 岐阜都ホテル, 平成22年5月.
- ② 若竹雄治 元田弘敏 井上茂樹 平上二九三 : 正常ヒト細胞における温熱療法効果の分子生物学的検討. 第44回日本理学療法学会大会, 東京国際フォーラム, 平成21年5月.

- ③ 井上茂樹 元田弘敏 若竹雄治 日高正巳 平上二九三：培養細胞を用いた非温熱下による電磁波刺激の影響. 第44回日本理学療法学会大会, 東京国際フォーラム, 平成21年5月.
- ④ 井上茂樹 元田弘敏 若竹雄治 平上二九三：培養細胞を用いたマイクロ波治療効果の検討. 第43回日本理学療法学会大会, 福岡国際会議場, 平成20年5月.
- ⑤ 若竹雄治 井上茂樹 元田弘敏 平上二九三：正常ヒト細胞の三次元様増殖を指標とした温熱療法における最適条件の検討. 第43回日本理学療法学会大会, 福岡国際会議場, 平成20年5月.

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平上 二九三 (HIRAGAMI FUKUMI)
吉備国際大学・保健科学部・教授
研究者番号：6 0 2 7 8 9 7 6

(2) 研究分担者

加納 良男 (KANO YOSHIO)
吉備国際大学・保健科学部・教授
研究者番号：2 0 2 2 4 5 5 3
秋山 純一 (AKIYAMA JUNICHI)
吉備国際大学・保健科学部・准教授
研究者番号：0 0 3 0 9 6 0 0
元田 弘敏 (MOTODA HIROTOSHI)
吉備国際大学・保健科学部・講師
研究者番号：3 0 2 7 8 9 9 9