

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：35308

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650341

研究課題名(和文)細胞内シグナル伝達変異細胞を利用したリハビリテーション効果発現機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism for efficient rehabilitation using cell signaling mutant cells

研究代表者

加納 良男 (Kano, Yoshio)

吉備国際大学・保健医療福祉学部・教授

研究者番号：20224553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞内シグナル伝達変異細胞を利用して、神経再生とリハビリテーション効率を向上させるための実験を行いリハビリテーションの分子メカニズムを解明し、脳梗塞等による麻痺の回復を目的とした。そのため我々が開発した3種類の細胞内シグナル伝達変異細胞を用いて実験を行い、大きく3つの成果を得ることができた。(1)温熱療法等のリハビリテーション刺激は、細胞内シグナル伝達系のp38キナーゼを働かせて神経再生を促進させていることが判明した。(2)脳梗塞片マヒの改善に働くアセチルコリンは同伝達経路のERK酵素が働いていることが判明した。(3)神経細胞の長期生存にはAkt酵素が働いていることが判明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we carried out experiments using cell signaling mutant cells to improve nerve regeneration and efficiency of rehabilitation with the aims of elucidating the mechanism of rehabilitation at the molecular level and establishing a method for recovery of paralysis due to cerebral infarction. In the experiments, we used three newly developed cell signaling mutant cell lines and found that (1) rehabilitation stimulus by, for example, thermotherapy, promotes nerve regeneration by acting p38 kinase in the cell signaling pathway, (2) acetylcholine, which acts to improve hemiplegia caused by cerebral infarction, activates ERK enzyme in the same signaling pathway, and (3) Akt enzyme functions for long-term survival of neurons.

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：p38MAPK JNK Akt PI3K ERK Aging Anti aging

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究は従来直接確認することができなかったリハビリテーションの効果を、我々が独自に開発した特殊な培養神経細胞を用い神経突起の誘導率を指標にすることによって、リハビリテーション効率を高める物理刺激や薬剤の開発を行うために計画された。実験に使用した PC12 細胞は、グリーンらによってラット副腎髄質褐色細胞腫から単離された神経分化能を有する細胞である。この細胞は株化した未分化細胞であるが、神経成長因子 (NGF) の添加によって長い神経線維を伸ばしニューロン細胞へと劇的に変化する。我々は、この PC12 細胞を用いて神経再生に有効な物質をスクリーニングすることを試みたが、PC12 細胞は NGF に対して高い感受性を示し、多数の神経線維を迅速に伸ばすために、たとえ有効な薬剤が存在してもそれを検出することができなかった。一方 PC12 細胞を培養していると、NGF に対して全く反応を示さない亜種が現れた。この PC12 変異細胞に対して我々は遺伝子操作を行なったところ NGF に弱い反応を示す細胞が出現した。この細胞に各種薬剤を添加したところ劇的な神経突起の誘導と伸長の増進作用が見いだされたので、我々はこの細胞を薬剤高感受性 PC12 細胞 (PC12m3 細胞) と名づけた。

(2) 我々が開発した PC12m3 細胞は、MAP キナーゼ (ERK) 経路に作用する神経成長因子には反応しないが、p38 経路に働く薬剤や物理刺激で、細胞死ではなく神経分化を起こすという特徴を持つ、MAP キナーゼ経路に変異をきたした特殊な培養神経細胞である。このような細胞は他に例がなく、リハビリテーションで用いられる物理刺激の神経系に対する効果発現機序の解析とリハビリテーション効率を高める物理刺激や薬剤の開発を行うことが可能になる。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、細胞内シグナル伝達変異細胞を利用して、神経再生とリハビリテーション効率を向上させるための実験を行いリハビリテーションの分子メカニズムを解明し、合わせて脳梗塞等による片麻痺等をリハビリテーションによって回復させる基礎を与えることを目的とした。そのため我々が開発した 3 種類の細胞内シグナル伝達変異細胞である、1. PC12m3 2. PC12m11 3. PC12m3-S 細胞を用いて研究を行う。

1. の PC12m3 細胞では、リハビリテーション効率を高める物理刺激や薬剤の効果について詳細な分析を行う。リハビリテーション効果の判定として、従来は筋力・関節可動域などの評価が行われている。これらはいわば蛋白質レベルでの質的・量的評価である。近年の分子生物学の進歩は蛋白質合成の前段階としての mRNA の発現や細胞内シグナル伝達の活性化を判定することを可能とした。細胞の増殖や分化はさまざまな遺伝子が順序正しく発現していく

ことで成就する。これにはいろいろな細胞外の刺激が、たくみに細胞内情報伝達経路を活用し遺伝子に伝えられることによって起こっている。この情報伝達経路は 2 つの経路に大別される。増殖因子によって働き細胞増殖や細胞分化を起こす MAP キナーゼ経路と熱や浸透圧、各種薬剤および放射線などのいろいろな環境因子によって働き細胞死に至る p38、JNK 経路である。この 2 つの経路は独立に働くことで細胞が増殖するか細胞死を起こすかという細胞の運命を決定することで生体の恒常性を保っている。

リハビリテーションで用いられる運動療法や物理療法刺激は一方では間接的に増殖因子の産生を介して MAP キナーゼ経路を活性化し、もう一方では直接的に p38、JNK 経路を介して細胞死をもたらすとともにクロストークによって複雑な効果を現していると考えられる。そのため通常的手法ではリハビリテーション効果の分子生物学的解析は困難であった。すなわち、リハビリテーションとしての刺激が細胞増殖を引き起こしたとしても、MAP キナーゼ経路の作用が強すぎて細胞本体に直接働く p38、JNK 経路の作用は覆い隠されてしまう。

そこで我々は神経再生の研究に用いられているラットの副腎髄質褐色細胞腫由来の PC12 細胞から遺伝子操作によって、MAP キナーゼ (ERK) 経路に作用する神経成長因子には反応しないが、p38 経路に働く薬剤や物理刺激で、細胞死ではなく神経分化を起こすという特徴を持つ、MAP キナーゼ経路に変異をきたした特殊な培養神経細胞である PC12m3 を分離することに成功した。この特殊な細胞を利用することにより神経細胞に対する直接的効果を検証できる。この細胞を用いて分子生物学的に解析を行うことによりリハビリテーション効果の発現機序を明らかにするとともに、その効率を高める薬剤や物理刺激の発見、開発を行うことを目的とした。

(2) 2 の PC12m11 細胞では、脳梗塞片マヒのリハビリテーション効果向上の検討を行う。脳梗塞治療において神経の再生を促し片麻痺のリハビリテーション効率を高めるために、培養神経細胞を用いて再生力を高める因子を見つける。神経再生時の軸索末端と筋の接続の効率を高める因子を見つけるために PC12m11 細胞を使用する。PC12m11 細胞は、神経伝達物質の 1 つであるアセチルコリンに反応して神経突起を伸長するアセチルコリン高感受性変異細胞である。そこで、PC12m11 細胞を用いた実験ではアセチルコリンがどのようなメカニズムで神経再生に働いているかについて解析をおこなう。

(3) 3 の PC12m3-S 細胞では、神経細胞の長期生存のメカニズムと長期生存に働く要因の検討を行う。PC12m3 細胞の培養を数年続けている時、神経成長因子や薬剤

には反応せず、高浸透圧等の物理的刺激によってのみ神経突起の伸長や再生を行う細胞が出現したのでクローニングを行い PC12m3-S 細胞と名付けた。この細胞に物理的刺激を与えると神経細胞に分化し、細胞 1 個でも長期間生存する。そこで本研究においては、その長期生存のメカニズムを調べるため、PC12m3-S 細胞にいろいろな物理的刺激を与えて、神経細胞死に働く JNK と生存に働く p38 キナーゼ活性の関連性をウエスタンブロット法で検出し、正常な PC12 細胞と比較してみる。また PC12m3-S 細胞が長寿になった原因はどの遺伝子の突然変異によるかについても検討を試みる。

3. 研究の方法

(1) 既に得られている 3 種類の細胞内シグナル伝達変異細胞を用いて、神経再生とリハビリテーション効率を向上させるための実験を行うのであるが最初 1 の PC12m3 細胞を用いたリハビリテーション効果発現機序の解明と、その効率を高める物理刺激や薬剤の開発について検討する。

高浸透圧や熱ショックなど細胞にストレスを与える要因がこの細胞では細胞死ではなく細胞分化に働き神経突起を誘導する。この細胞では PC12 親細胞に比べ p38 キナーゼ活性が極めて高いことがわかっているが、p38 キナーゼの阻害剤はどのように働くか検討する。またリハビリテーションで用いられる、電気刺激、超音波、バイブレーション、温熱療法などの物理刺激はどれも PC12m3 細胞の p38 キナーゼを活性化するが、過度な刺激は JNK を活性化して細胞死に働くので、最適刺激量を決定し、リハビリテーションでの物理療法の効率を高めるための目安とする。さらに JNK 活性を抑制し p38 の活性化に働く薬剤の開発も行う。

PC12m3 細胞の親細胞である PC12 細胞は、グリーンらによってラット副腎髄質褐色細胞腫から単離された神経分化能を有する細胞である。この細胞は、米国 Rockville, ME の American type culture collection より購入した。

細胞は、10 %ウマ血清と 5 %牛胎児血清それに 80 µg/ml のカナマイシンを含む高グルコース型 DME 培地を用いて継代し維持した。細胞の培養は、炭酸ガス培養器を用い、5% CO₂ で 37 °C で行ない、培地交換は 3 日おきに行なった。継代は、細胞が培養シャーレ一杯になるとピペティングし、1~3 x 10⁴ cells/cm² で新しいシャーレに蒔きなおすという方法により行なった。細胞は常時マイコプラズマ感染の有無を Hoechst 33258 で染色して調べ、感染のないことを確認して実験を行なった。用いたリハビリテーション刺激は多数あるが例として熱ショックと高浸透圧を、細胞内シグナル伝達系は p38MAP キナーゼの活性化を調べた。細胞への熱ショックのための温熱処理は恒温槽を用い、フラスコに播いた細胞に熱ショックを 4 分、3 分、5 分、10 分、

20 分、30 分与えることで行った。

細胞への物理的刺激としての高浸透圧処理は培地に 4 M の NaCl 溶液を最終濃度が 1.42% になるように加えることで行った。これは、4 M の NaCl 溶液は水に溶解しニトロセルロースフィルター（ポアサイズ 2 µm）で濾過することによって作製したものである。温熱処理あるいは高浸透圧処理を施した細胞は p38MAP キナーゼの活性化を調べることによって物理化学的刺激受容体（PTK）の活性化を検出した。活性化した p38MAP キナーゼの検出は免疫ブロット方によって行った。方法は、PC12 親細胞と PC12m3 の細胞 100 万個を 25 cm² のフラスコに蒔き、5 日間培養後無血清下で物理化学的処理を施し p38MAPK 酵素活性の計測を行った。測定は細胞から全蛋白質を抽出し 8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画後ポリビニールメンブレンにブロットした。ブロットした蛋白質はホスホ p38MAPK 抗体を作用させてリン酸化した p38MAPK の検出を行った。

(2) 2. PC12m11 細胞を用いた研究では、脳梗塞片麻痺のリハビリテーション効果向上の検討を行う。PC12m11 細胞は、神経伝達物質の 1 つであるアセチルコリンに反応して神経突起を伸長するアセチルコリン高感受性変異細胞である。我々は、予備的にはラットの心臓由来の H9C2 細胞が筋管細胞から骨格筋細胞へと分化し、アセチルコリンに反応した脱分極が起こり PC12m11 細胞の軸索末端が接続することを見つけている。そこで今回の研究では、PC12m11 細胞の軸索末端が接続している H9C2 筋管細胞にアセチルコリンの濃度や刺激回数を変えたり、他の因子を与えて、どれが最も接続の強化に働くかを調べて、脳梗塞のリハビリテーション効果を高めるか検討する。

PC12m11 細胞に外部刺激が与えられた時に働くシグナル伝達たんぱく質の検出は、1. の PC12m3 細胞と同様にウエスタンブロット法にて行う。しかし PC12m3 細胞の場合と異なって、外部刺激としては物理刺激ではなく神経伝達物質であるアセチルコリンを使用する。また検出するシグナル伝達たんぱく質は MAP キナーゼファミリーの ERK, p38MAPK そして JNK である。

さらに、PC12m11細胞を用いたリハビリテーション効果向上のためのパッチクランプ法による検討も行う。筋の収縮は、神経の軸索末端が筋に接続している所で軸索末端から筋のレセプターにアセチルコリンが放出されることによって起きる。この時神経細胞は軸索を介して電気を送っており、その電気が軸索末端でMAPキナーゼを活性化させてアセチルコリンを放出している。一方、アセチルコリンを受けとった筋細胞は脱分極することでイオンチャンネルが開くことにより筋が収縮する。この時アセチルコリンはレセプターにどのよ

うな割合で結合し、イオンチャンネルがどのような割合で開くかは、パッチクランプ法によって正確に測定することができる。そこで、アセチルコリンレセプターをもっているPC12m11細胞とH9C2細胞における神経筋接続は、アセチルコリンを投与するとどのような現象が起こるかパッチクランプ法によって解析を行なう。

(3) 3. PC12m3-S 細胞を用いた研究では、生き残り神経細胞を長期生存させ最大限に活用させるための検討を行った。PC12m3-S 細胞は物理的刺激を与えない状態では丸い形態をしておりどんどん増殖するのみである。この細胞の少数を 25 cm² のシャーレに蒔いて物理的刺激を与え 1~2 週間培養すると神経細胞に分化する。この細胞は近くには他の細胞はなく、シャーレ全体でも 1 個~数個しかない状態でも長期間生存する。この細胞は神経成長因子の存在しない状態で神経細胞の形態を保ち、さらに近くに他の細胞のない単一の状況下でも物理刺激を与えると生存し活動している。そこで PC12m3-S 細胞が長寿になった原因はどの遺伝子の突然変異によるかについても検討を試みる。さらにその長寿遺伝子を活性化する物質が自然界に存在しているか、つまり長寿物質の探索も行った。

リハビリテーション刺激を与えた PC12m3-S 細胞のシグナル伝達たんぱく質の検出は 2 つの経路で分析を行った。つまり、外部刺激は受容体 (PTK) によって受け取られ、それは 1 つ目としては MAP キナーゼを活性化し、2 つ目は PI3K-Akt 経路を活性化する。そこでこの 2 つの経路の活性化を同時に調べて、どちらの経路がより優位に働いているか検討する。具体的には、受容体 (PTK) の活性化は、物理刺激又は増殖因子添加処理をほどこした細胞の細胞内シグナル伝達系の活性化の有無によって検出した。用いた物理刺激は熱ショック、高浸透圧、電気刺激等であり、増殖因子は PDGF 増殖因子を大量に含む血清を用い、細胞内シグナル伝達系は p38MAPK と Akt キナーゼの活性化を調べた。物理刺激処理又は増殖因子処理を施した細胞は p38MAPK と Akt キナーゼの活性化を調べることによって受容体 (PTK) の活性化も検出できる。活性化した p38MAPK と Akt キナーゼの検出は免疫プロット方によって行った。方法は、PC12 親細胞、PC12m3 細胞、PC12m3-S 細胞およびヒト正常繊維芽細胞 100 万個を 25 cm² のフラスコに蒔き、5 日間培養後無血清下で 10% 血清添加処理を行い酵素活性の計測を行った。測定は細胞から全蛋白質を抽出し 8% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画後ポリビニルメンブレンにプロットした。プロットした蛋白質はホスホ p38MAPK とホスホ Akt 抗体を作用させてリン酸化した p38MAPK と Akt の検出を行った。また自然界に存在する長寿物

質の検出は、その物質が Akt 活性を阻害するかどうかで検出する。

4. 研究成果

(1) 1 の PC12m3 細胞では、リハビリテーション効率を高める物理刺激や薬剤の効果について詳細な分析を行った。物理刺激では主として温熱療法に用いられる温熱の PC12m3 細胞に与える影響について検討し、その効果が p38 キナーゼを介して神経突起の促進として現れ、p38 キナーゼの阻害剤である SB20358 はその効果を大きく抑制することが解った。さらに過度な温熱刺激は JNK 酵素を活性化して細胞死に働くことが判明した。次に薬剤としては主としてアロマセラピーに用いられるリモネンについて検討した。リモネンはみかんの皮に含まれる精油の成分である。このリモネンが PC12m3 細胞の神経活性に働くかどうかについて詳細に分析を行い、これも p38 キナーゼが働いて神経突起伸長の促進作用があることが判明した。物理刺激の具体例としては、PC12m3 細胞 100 万個を 25 cm² のフラスコに蒔き、5 日間培養後無血清下で熱ショックを 44 3 分、5 分、10 分与えると p38MAPK が活性化し、44 20 分では活性が減少することが解った。一方、PC12 親細胞では、p38MAPK は熱ショックによる活性が弱いことが判明した。(図 1)

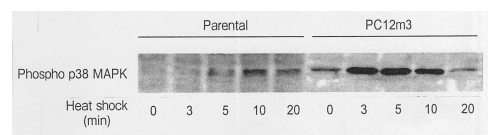


図 1 熱ショック受容体活性化による p38MAPK の活性

このように、熱ショックによる p38MAPK の活性は、PC12m3 が PC12 親細胞より大幅に強いものであり、また熱ショックによる高い神経突起の誘導も見られた。

次に、PC12m3 の細胞 100 万個を 25 cm² のフラスコに蒔き、5 日間培養後無血清下で高浸透圧処理を行なったところ PC12 親細胞に比べ、PC12m3 の細胞において高浸透圧刺激によって高い p38 MAP キナーゼの活性が見られた。これらの結果、物理化学的刺激としての熱ショックと高浸透圧は、どちらも p38MAPK を活性化するが、これらはいずれも物理化学的処理によって PTK の活性化が起こったことを示している。

我々は最初 PC12m3 細胞の熱ショックによる神経分化の p38MAPK の役割について研究した。PC12m3 細胞は 44 10 分の熱ショック処理によって p38MAPK が活性化し神経突起の大きな形成促進が見られた。PC12 親細胞では熱ショック処理によって ERK と p38MAPK の両方が活性化されるが、PC12m3 細胞では熱ショックで

p38MAPK のみが活性化される。さらに熱ショックによる PC12m3 細胞の p38MAPK のリン酸化は PC12 親細胞よりはるかに高いものであった。高浸透圧は細胞の p38MAPK と ERK の両方を活性化することができる。p38MAPK の阻害剤である SB203580 は高浸透圧が誘導する CREB の活性を抑制するが、ERK の阻害剤である U0126 は作用しないことから、ERK ではなく p38MAPK が高浸透圧によって CREB を活性化するための上流のシグナル伝達タンパク質であることを示した。

(2)2 の PC12m11 細胞では、脳梗塞片マヒのリハビリテーション効果向上のための基礎実験を行った。PC12m11 細胞はアセチルコリンに高感受性があり、細胞内シグナル伝達経路の ERK 酵素が働いていることが判明した。アセチルコリンは神経と筋細胞との接続に働いているがそのメカニズムを解明するためにパッチクランプ法を行ったがまだ完成できず実験を続行している。

(3)の PC12m3-S 細胞では、神経細胞の長期生存に働く要因について検討した。神経細胞の長期生存にはどのような細胞内シグナル伝達酵素が関与しているかについて調べたところ研究計画時に予想していた p38 キナーゼではなく新たに Akt 酵素が働いていることが判明した。PC12 親細胞と PC12m3-S の細胞に NGF, EGF, FGF などの増殖因子あるいはインスリンを作用させて Akt の活性化を調べたところ、PC12 親細胞は増殖因子とインスリンのどちらも Akt を活性化したが、PC12m321 細胞はインスリン系以外の増殖因子によって Akt を活性化しないことが判明した(図2)。

	Parental		PC12mutant	
Phospho Akt				
NGF	-	+	-	+
EGF	-	-	+	-
Insulin	-	-	-	+

図2 増殖因子とホルモン受容体活性化による Akt の活性

Akt は PI3K によって活性化するシグナル伝達タンパク質であるので、PC12m3-S 細胞は PI3K に突然変異があることが推測できた。PC12m3-S 細胞は高度に温熱ショック抵抗性であることが判明しその原因は Akt 経路を支配している PI3K 遺伝子の突然変異があることが判明した。それは、Akt がアポトーシスを誘導する Bad をリン酸化して Bad を不活性化することでアポトーシスを回避して温熱ショック抵抗性に行っている。さらに PI3K-Akt 経路阻害物質をリハビリテーションを行う数時間前に投与して PI3K-Akt 経路を抑制しておき、

その後リハビリテーション刺激を与えて PI3K-Akt 経路を活性化するとアポトーシスを回避できるのでより強いリハビリテーション刺激を与えることができることを解明した。この方法を用いると、リハビリテーション効果を高めることが出来る可能性が示唆された。

(4) PC12m3-S 細胞の PI3K 突然変異による熱ショック抵抗性の理由について検討した。我々は、PC12m3-S 細胞における PI3K の酵素活性を制御する調節サブユニットである p85α と p85β の遺伝子の塩基配列をしらべたところ p85β に1個の突然変異があることを発見した。熱ショックの受容体は TRPV1 であり唐辛子の辛み成分であるカプサイシンの受容体でもある。熱ショックは受容体 TRPV1 で受け取られ、p38MAPK の活性化は熱ショックから細胞を守っている。一方、高浸透圧ショックの受容体はアクチンタンパク質であり、同様に p38MAPK を活性化して細胞は高浸透圧から身を守っている。このように受容体と外部刺激が異なっても同じ細胞内シグナル伝達系の p38MAPK を使うことによって細胞は自分を守っているのである。PC12m3-S 細胞は、同じ物理刺激でも異なった反応を起こして熱抵抗性を示した。これは物理刺激受容体系の突然変異ではなく、増殖因子受容体系の突然変異によって物理刺激(熱ショック)による細胞ダメージから細胞を守っていることが判明し、異なった情報伝達系が間接的に働いて他の経路を干渉するという新たな発見でもあった。具体的には、我々は PC12 細胞において、受容体チロシンキナーゼ(PTK)にはシグナル伝達系 PI3K の p85 が優先的に会合しており、p85 の突然変異体は p85 のチロシンキナーゼへの会合に異常が生じインスリン系以外の増殖因子によって Akt 活性が起らないことを発見した。PI3K は多くの種類があるが、主として p110 と p85 がダイマーを作って働いており、p110 は触媒サブユニットであり p85 は SH2 ドメインをもつ調節サブユニットで活性型チロシンキナーゼに会合させる働きをもつ。P85 には p85 と p85 があり、PC12m3-S 細胞は p85 に突然変異をもっていたのである。しかし、この PC12m3-S 突然変異細胞の p85 は正常であり、非受容体型チロシンキナーゼが物理的的刺激によって活性化した時、新たな Akt の活性化が起こり PC12m3-S 細胞は高熱から細胞を守ることを見いだした。

(5) 自然界における長寿物質の探索を行った。我々は、菌類抽出物の中には PTK 活性(PTK-PI3K-Akt)を抑制する物質(図3)と PTK を活性化する物質が含まれていることを発見した。菌類の中にはラパマイシン(すでに判明している長寿物質)のように PI3K-Akt 活性を阻害する物質があることがわかっており、今回我々は菌類が Akt の阻害のみならず活性化する物質も作っていることを見いだしたのである。

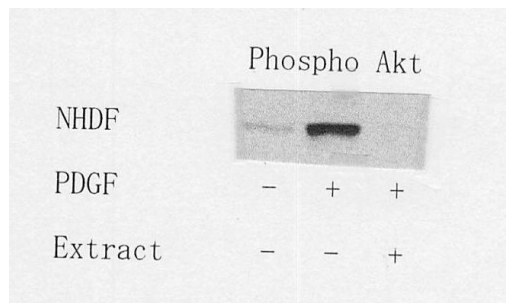


図3.増殖因子受容体活性の阻害

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9件)

Koike Y, Kondo H, Kondo S, Takagi M, Kano Y. Effect of a steam foot spa on geriatric inpatients with cognitive impairment: a pilot study. Clin Interv Aging. 査読有、2013;8:543-8. doi: 10.2147/CIA.S44005. Epub 2013 May 16.

加納 良男, 平上 二九三, 元田 弘敏, 小池 好久, 四宮 美佐枝, 井上 茂樹, 河村 顕治 Akt 酵素の活性に変異をもつ新しい PC12 細胞の出現吉備国際大学保健福祉研究所研究紀要 (1345-479X)14 号 Page45-48(2013.03)

元田 弘敏, 井上 茂樹, 加納 良男, 平上 二九三、ストレッチ刺激による筋芽細胞株の分化への影響 Myogenin および Myosin タンパク質発現の解析、吉備国際大学保健福祉研究所研究紀要(1345-479X)14 号 2013, Page4 1-4 4

河村 顕治, 加納 良男, 変形性膝関節症の疼痛に対する温熱と電気刺激併用による物理療法の効果、吉備国際大学保健福祉研究所研究紀要 (1345-479X)14 号 2013, Page3 3-3 6

Misae Shinomiya, Kenji Kawamura, Emiko Tanita, Megumi Nagoshi, Hirotooshi Motoda, Yoshiko Kasanami, Fukumi Hiragami, Yoshio Kano, Neurite Outgrowth of PC12 Mutant Cells Induced by Orange Oil and d-Limonene via the p38 MAPK Pathway, Acta Med Okayama、査読有、2012, 66(22) 111-118

井上 茂樹、平上 二九三、元田弘敏、小池 好久、若竹 雄治、河村 顕治、加納 良男、PC12 細胞における非温熱下マイクロ波照射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 (1345-479X)13 号 2012, Page9-13

加納 良男、平上 二九三、元田 弘敏、小池 好久、四宮 美佐恵、井上 茂樹、河村 顕治、PC12 細胞から PI3K の突然変異によって出現した新しい熱抵抗性 PC12m321 細胞の解析、吉備国際大学保健福祉研究所研究紀要 (1345-479X)13 号 2012, Page47-50

河村 顕治、加納 良男、表面筋電図によるセッティングとシーティングベルト CKC エクササイズの評価、吉備国際大学保健福祉研究所研究紀要 (1345-479X)13 号 2012, Page9-27-30

Hirotooshi Motoda, Yoshiho Kano, Fukumi Hiragami,

Kenji Kawamura and Hideaki Matsumoto, Changes in rupture formation and zonary region stained with Evans blue during the recovery process from aluminum toxicity in the pea root apex, PLANT signaling & behavior, 査読有、2011, Volume 6, Issue 1 98-100

〔学会発表〕(計 1 件)

加納 良男

健康寿命を延伸させる新たな遺伝子の発見 第18回岡山リサーチパーク研究・展示発表会、2014年3月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：トランスジェニック非ヒトほ乳動物

発明者：加納良男、河村顕治、平上二九三
元田弘敏、秋山純一

権利者：吉備国際大学

種類：特許

番号：2013-45171

出願年月日：2013年3月7日

国内外の別：国内

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

加納 良男 (KANO, Yoshio)

吉備国際大学・保健医療福祉学部・教授
研究者番号：20224553

(2)研究分担者

河村 顕治 (KAWAMURA, Kenji)

吉備国際大学・保健医療福祉学部・教授
研究者番号：40278974

(3)連携研究者

(0)

研究者番号：