

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462314

研究課題名(和文) 運動前温熱療法による関節軟骨変性予防効果のエビデンスの確立

研究課題名(英文) Establishment of the Evidence of Thermal Therapy before Exercise Protecting Articular Degeneration

研究代表者

北條 達也 (HOJO, TATSUYA)

同志社大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号：40298740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト関節軟骨細胞の分化誘導開始48時間目に37, 39, 41, 43 °C × 20分間の1回目温熱刺激(1st HS)を適応した。その24時間後に45 °C 15分の致死的温熱刺激(2nd HS)を与えた。さらに8時間後のcell viabilityを評価した。1st HSの24時間後に、HSP-70および基質代謝をmRNA発現で評価した。HSP-70の発現は温度依存的に亢進した。基質代謝は41 °C群で最も亢進し、2nd HS後も41 °C群が高値を示した。2nd HS後のcell viabilityは、41 °C群において最も維持された。適度な温熱刺激はHSP70発現を誘導しストレス耐性を高めることが示された。

研究成果の概要(英文)：Cultured human articular chondrocytes were subjected to the 1st HS in a thermal bath (37, 39, 41, 43 °C for 20 min) after 48 h of differentiation. Then, 24 h after the 1st HS, half of them were exposed to fatal stress (2nd HS at 45 °C) for 15 min. Cell viability was measured 8 h after 2nd HS. Twenty-four hours after each HS, Hsp70, proteoglycan, and type II collagen mRNA expressions were quantified by rt-PCR.

After the 1st HS, Hsp70 expression gradually increased with increase in temperature of the HS. Proteoglycan and type II collagen gradually increased until HS at 41 °C. HSP70 expression level significantly increased 24 h after the 1st HS at 41 °C compared with that in untreated chondrocytes. Moreover, chondrocytes pretreated at 41 °C showed increased cartilage matrix gene expression and the most tolerance to the 2nd HS. Appropriate HS caused increase in HSP70 expression, leading to enhancement of chondrocytes' tolerance to heat stress.

研究分野：スポーツ医学

キーワード：関節軟骨 軟骨細胞 温熱刺激 Heat Shock Protein 70 基質代謝 アポトーシス

#### 1. 研究開始当初の背景

スポーツ活動における関節傷害は下半身に多く発生し、特に足関節や膝関節は傷害発生率が高く、特に主要な荷重関節である膝関節は重症化しやすいと報告されている(岩噌ら 2005; 高橋ら 2010)。その要因の一つとしてオーバーユースやオーバーロードが挙げられる。アスリートは、青少年期から過度の力学的ストレスが反復して関節軟骨に加わり続けることで、加齢によって生じる軟骨変性よりも早く変性が進行する(立花 2005)。そのため、将来的に変形性関節症となるリスクが高い。

また、近年は健康志向から中高年のスポーツもブームになってきており、政府もメタボリックシンドロームやロコモティブシンドローム対策に運動療法を積極的に推奨している。しかし、加齢とともに多くの人は徐々に関節軟骨変性が進み、変形性関節症の要因となる。変形性関節症は運動の阻害因子の1つであり、中高年者に安全な運動を実践してもらうためには、積極的に関節軟骨を保護することが重要になる。

温熱療法は、従来は物理療法としてトレーニング後や疲労に対するリハビリやコンディショニングに温熱療法が幅広く利用されている(Sarzi-Puttini et al. 2005)。特に変形性関節症や関節リウマチなどの関節疾患では、運動療法などの理学療法とともにホットパックや超短波が汎用されている。軟部組織に対する温熱の効果には、温熱による局所効果と遠隔効果がある。遠隔効果の主なものは、血流による温熱の移動や自律神経系を介した生体反応である。一方、局所効果には、温熱によるコラーゲン線維の易伸展性の亢進(Lehmann et al. 1970)、疼痛閾値の上昇による鎮痛効果(Lehmann et al 1958)、

筋紡錘の伸展感受性の低下による筋緊張低下作用(Mense et al 1978)、局所血流増加作用(Abramson et al 1961)、組織代謝増加作用などがあるとされている。一般に運動器に対するリハビリテーション治療に応用されている温熱療法は、この局所効果を利用して患部局所の鎮痛をはかりながら筋の緊張を取り、関節の可動域訓練を行う補助療法と考えられてきた。そのため、関節軟骨を保護する直接的な目的をもって利用されてはいない。

一方、ヒートショックプロテイン(Heat Shock Protein: HSP)は、熱などの外界環境から受ける様々な負荷に対応して、生体防御機能を発揮するストレス応答蛋白である。HSPは、生体内のタンパク質分子が正しい折りたたみ(フォールディング)をして正常な機能を獲得することを助けるシャペロン機能を有する。HSPファミリーは分子量によりそれぞれの名前が付けられ数種類のHSPがあり、それぞれに異なった特徴が報告されている

(Parcellier et al 2003)。ストレスによってタンパク質が傷害されて異常なタンパク質が細胞内に蓄積すると、HSPは構造異常を起こしたタンパク質を修復、または修復不可能な場合は分解を促進して細胞を保護する。HSPファミリーの中でも本実験の研究対象とするHeat shock protein 70(HSP70)は主要なHSPのひとつであり、物理的、科学的ストレス負荷時の誘導量が多く、様々なストレスから細胞を防御する役目を果たしている

(Gloria et al 1991)。HSP70の誘導剤であるMG132およびグルタミンを変形性関節症動物モデルの関節内へ投与することにより関節軟骨変性が軽減されることが明らかにされている(Etienne et al 2008)。さらに、MG132およびグルタミンを培養軟骨細胞に添加すると細胞傷害

性ストレスから保護することが報告されている(Grossin et al 2004; Tonomura et al 2006) . MG132 およびグルタミンは HSP70 以外の効果を軟骨細胞に及ぼしている可能性があるが, HSP70 は細胞傷害性ストレスから軟骨細胞が保護するという報告 (Kubo et al 2001) や, 関節軟骨細胞に対する HSP70 遺伝子の導入が一酸化窒素によって誘導される軟骨細胞のアポトーシスを劇的に抑制することが示されている (Terauchi et al 2003) . これらの結果から, HSP70 が軟骨保護作用を持つと考えられる .

## 2 . 研究の目的

アスリートは, 青少年期から過度の力学的ストレスが反復して関節軟骨に加わり続けるが, 直接的に関節軟骨を保護する方法はなく, 加齢によって生じる軟骨変性よりも早く軟骨変性が進行しやすいため, 関節に何らかの予防的処置を加えることで, 軟骨変性の進行を抑制する可能性を追求したいと考えた .

HSP は温熱により誘導される蛋白質であり, なかでも HSP70 は物理的, 科学的ストレス負荷時の誘導量が多く, 様々なストレスから細胞を防御する役目を果たしている . このことから, HSP70 を運動前に誘導することができれば軟骨保護作用を高め, 変性予防に利用できる可能性があると考えられる .

そこで本研究では, 温熱刺激により HSP70 の発現を誘導し, 軟骨細胞がストレス耐性を高める可能性を検討し, 温熱療法関節軟骨への軟骨保護効果のエビデンスについてヒト軟骨細胞を用いて確立することを目的とした .

## 3 . 研究の方法

ヒト関節軟骨細胞 (NHAC-kn, Lonza) 培養し, 分化誘導開始 48 時間目に 37

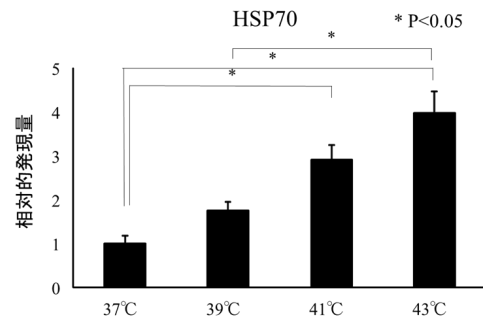
39 41 43 の温熱刺激を 20 分 (1st HS) 行った . 温熱刺激はディッシュにテープで防水処理し, 37 , 39 , 41 , 43 の各条件温度に設定した恒温槽に浸漬した .

温熱刺激後インキュベーター内で 24 時間培養を行い, その後 45 15 分の致死的温熱の高ストレス (2nd HS) を適用した .

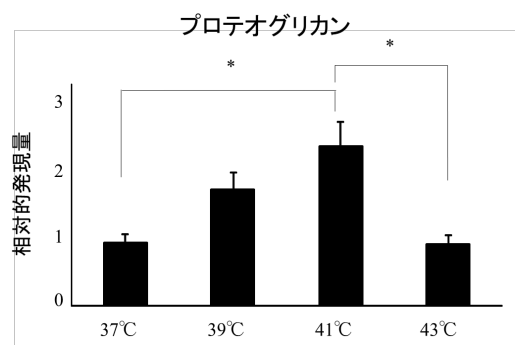
2nd HS 8 時間後に cell count および LDH assay によって cell viability の確認をした . また, 1st HS, 2nd HS 24 時間後に rt-PCR 法により HSP70, II 型コラーゲン, プロテオグリカンの遺伝子発現を測定した .

## 4 . 研究成果

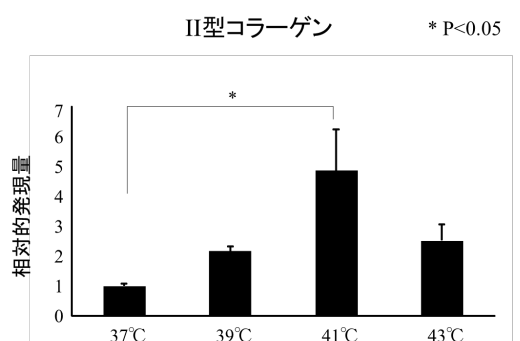
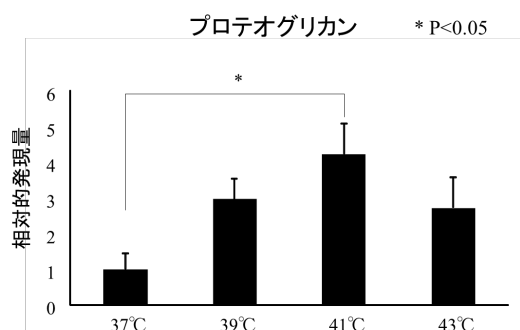
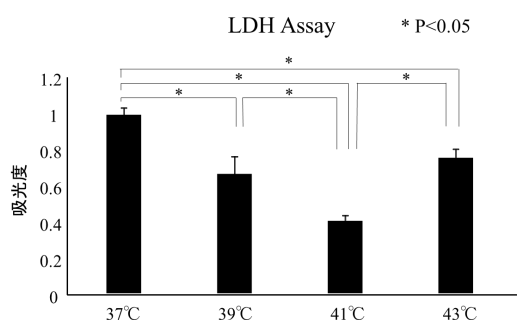
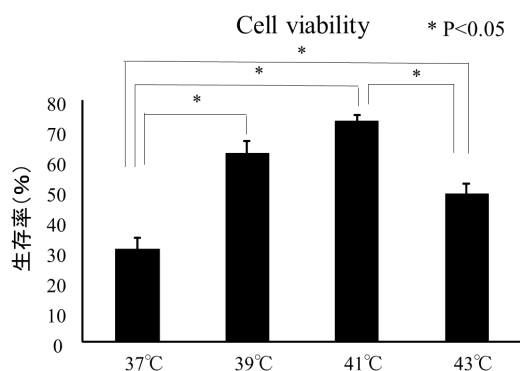
1st HS 後は, HSP70 の mRNA 発現が温度依存的に増加した .



II 型コラーゲン, プロテオグリカンの mRNA 発現は, 41 群において最も高値を示した .



2nd HS 後は, 1st HS41 群の cell viability (cell count 高値・LDH assay 低地) , II 型コラーゲン, プロテオグリカンが最も高値を示した .



適度な温熱刺激は、HSP70 の発現を誘導し、軟骨細胞の活性化を高め、致死的ストレスに対する耐性が亢進することが in vitro のレベルで示され、軟骨変性予防や変形性関節症の治療に積極的に応用できる可能性が示唆された。これまで補助療法として考えられてきた温熱療法は、

選手生命や健康寿命の延伸に寄与することが期待される。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

2016 European College of Sport Science,  
DATE: 6 to 9/July/2016  
Place: Vienna (Austria)  
Title: HEAT STIMULATION-INDUCED INCREASE IN HSP70 EXPRESSION ENHANCES TOLERANCE OF HUMAN ARTICULAR CHONDROCYTES

Speaker: Takakura H, Tanaka S, Tachibana M, Ueno D, Nakamura M, Izawa T, Hojo T

第 81 回日本温泉気候物理医学会・学術集会

日時：平成 28 年 5 月 15 日

場所：ホテル天坊（群馬県・渋川市伊香保）

タイトル：温熱刺激による軟骨細胞保護効果の検討

演者：北條達也，田中誠智，高倉久志，橘 未都，中村雅俊，今枝美和，井上基浩

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）s

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

北條 達也 (H0J0, Tatsuya)

同志社大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号：40298740

### (2)研究分担者

井澤 鉄也 (IZAWA, Tetsuya)

同志社大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号：70147495

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：