

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K20004

研究課題名（和文）クライオセラピーにおける分子メカニズムの探索

研究課題名（英文）Investigation of molecular mechanisms in cryotherapy

研究代表者

菅澤 威仁（Sugasawa, Takehito）

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：60821840

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：クライオセラピーはスポーツ現場や医療現場において運動器局部の外傷や肉体疲労のケアとして古くから汎用されているが、その分子メカニズムや治療効果は未だ明らかでない。そこで本研究ではクライオセラピーの効果の分子メカニズムを細胞やモデル動物を用いて明らかにすることを目的とした。実験では、細胞やモデル動物に対し、クライオセラピーを模倣する冷却刺激に暴露し、分子生物学的手法を用いて様々な解析を行った。その結果、クライオセラピーはミトコンドリア生合成や組織のリモデリングに関与するシグナル分子の活性化や遺伝子発現を増加させる事が観察され、クライオセラピーの分子メカニズムの一端を明らかにすることが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの先行研究の報告では、外傷局部に対するクライオセラピーには治療的効果があるとする報告と、無とする報告が複数混在している。さらに、我々が医療やスポーツ現場において仕事をこなす中、クライオセラピーを推奨する術者と、そうでない者が混在し、クライアントが治療方針に関し混乱を来すことが多くなる。本研究結果から考察するに、適切な方法の基に実施されるクライオセラピーは、組織修復や疲労回復に効果がある可能性があると言える。そのため、社会的な医療やスポーツ現場でクライオセラピーを実施する術者に対して、新たな洞察を提供出来、適切な施術・治療を実施する際の一つの助けになると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Cryotherapy has long been used in sports and medical settings for the care of local musculoskeletal injury and physical fatigue. However, its molecular mechanisms and therapeutic effects remain unclear. Therefore, the purpose of this study was to clarify the molecular mechanisms of the effects of the cryotherapy using cells and animal models. In the experiments, cells and model animals were exposed to cold stimulation that mimic the cryotherapy, and various analyses were performed using molecular biological techniques. The results showed that the cold stimulation increased the activation and gene expression of signaling molecules involved in mitochondrial biosynthesis and tissue remodeling, and revealed some of the molecular mechanisms of the cryotherapy.

研究分野：分子生物学

キーワード：クライオセラピー RNA-seq

## 1. 研究開始当初の背景

クライオセラピーはスポーツ現場や医療現場において運動器局所の外傷や肉体疲労のケアとして古くから汎用されているが、その分子メカニズムや治療効果は未だ明らかでない。クライオセラピーの先駆者である Kenneth (1997) が提唱するクライオセラピーの理論は全世界で広く浸透しているが、あくまで仮説の域を出ておらず分子レベルでの詳細な検討はされていない。またこれまでの報告では、局部に対するクライオセラピーには治療的効果があるとする報告 (Vieira RG. et al., 2016; 他) と、無とする報告 (Sarver DC. et al., 2017; 他) が複数混在している。さらに、我々が医療やスポーツ現場において仕事をこなす中、クライオセラピーを推奨する術者と、そうでない者が混在し、クライアントが治療方針に関し混乱を来すことを多く経験した。すなわち、クライオセラピーに治療的効果があるのかどうか、学術的に大きな問いが社会で広まる一方である。以上より、「クライオセラピーのメカニズムや効果を創薬研究と同様に分子レベルで明らかにできれば、現場での混乱を防ぎつつ、一般やアスリートの方に対し根拠のあるクライオセラピーを個人の目的に応じて提供でき、QOL (Quality of Life) の向上に大きく寄与出来るのではないかと考え研究を実施する動機となった。

## 2. 研究の目的

本研究ではクライオセラピーの効果の分子メカニズムを細胞やモデル動物を用いて、薬剤の開発研究と同様のレベルで明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

まず、複数の哺乳類細胞株に対して、4℃の冷却刺激を15分間、1~3セット実施 (クライオセラピーを模倣) する実験系を組み立て (In vitro 実験)、免疫沈降法やウエスタンブロッティング、細胞の生存率などを計測し、冷却刺激が影響するシグナル経路の同定を試みた。

次に、マウスから摘出した筋組織を培養液に浸漬した状態で、上記と同様の実験を実施した (Ex vivo 実験)。

加えて、全身麻酔下のマウスの下肢に対して4℃の冷却刺激を15分間、3セット実施する実験系を組み立て (In vivo 実験)、リアルタイムPCRやウエスタンブロッティング法を兼用し、上記の In vitro 実験系で得られたデータの再現性や整合性を確認した。

その後、モデル動物をより適切に選定することを試みた。マウスを用いた In vivo 実験では、イソフルランを用いた全身麻酔を頻繁に使用したが、制御が難しく、実験にバイアスが入り込む余地が考えられたため、モデル動物をゼブラフィッシュに切り替え、実験系を再構築した。ゼブラフィッシュを用いた実験では、麻酔薬を使用することなく、15℃の冷水に15分間3セットゼブラフィッシュを浸漬することで冷却刺激 (クライオセラピーを模倣) を負荷し、その2時間後に筋組織を採取し (腹部から尾部の間の組織) RNA抽出およびRNAシーケンシングを実施した。シーケンサーから排出されたFastqファイルを用いて、バイオインフォマティクス解析を実施、全遺伝子の発現量を定量化し、発現変動のある遺伝子を抽出した。

## 4. 研究成果

In vitro 実験では、冷却刺激終了後5~15分間にCREB (cAMP response element binding protein) のリン酸化の大幅な亢進が観察され、その転写活性も増加させることが分かり、それは冷却刺激のセット数にも依存することを明らかにした。特に3セット繰り返す冷却刺激はCREBの転写活性を顕著に増加させた。さらに、3セット繰り返す冷却刺激後、2~3時間の時点では、AMPK (AMP-activated protein kinase) のリン酸化が大幅に亢進することも観察された。

Ex vivo 実験においても同様に冷却刺激によるCREBのリン酸化の亢進が観察され、特に3セット繰り返す冷却刺激はCREBがターゲットとする遺伝子の発現を顕著に増加させた。同様の結果は生きたマウスを用いた実験系でも観察された。前述の実験系は急性的な実験のため、継続的な冷却刺激を行う実験も生きたマウスを用いて実施したところ、わずかではあるがマウス下肢筋内のミトコンドリアDNAのコピー数の増加が認められた。本結果をまとめると、クライオセラピーは生体に対してシグナル分子であるCREBおよびAMPKを活性化させ、その後の生理学的応答を引き起こしていることが示唆された。ここまでの成果は定評のある国際誌へ発表した (Sugasawa et al., 2020, IJMS)。

ゼブラフィッシュを用いた実験のRNA-seqの結果では、冷却刺激が筋のリモデリングに関わるtrim63a, klhl38, fbxo30aの遺伝子発現を有意に増加させることが明らかとなり、タンパクレベルにおいてはMuRF1 (encoded by trim63a)の増加が観察され、本遺伝子はCREBやAMPKの活性化と関連することが知られているため、上述の結果を支持できると考えられた。本ゼブラフィッシュを用いた研究成果は定評のある国際誌へ発表した (Tamai, Sugasawa et al., 2022, BBRC)。

総合的に考察すると、クライオセラピーはシグナル分子であるCREBおよびAMPKを活性化させその下流の遺伝子の発現を増加させ、生体応答を引き起こしていることがおおよそ明らかに

なったと言え、繰り返すセット数も効果を引き出すための重要なファクターとなることが分かった。しかしながら、医療やスポーツ現場では、外傷や疲労に対してクライオセラピーが汎用される。本研究では正常の細胞、マウス、ゼブラフィッシュを用いた実験にとどまっているため、実際の外傷や疲労モデルに対して治療的な効果が発揮されるかどうかまでは、明らかにすることが出来なかった。CREB や AMPK の活性化はミトコンドリア活性や、組織のリモデリングに大きく関わると考えられるため、組織のレベルで適切な回数のクライオセラピーが損傷の治癒を促進させることが十分考えられる一方で、過多のクライオセラピーの実施は組織萎縮を引き起こす可能性も否定できない。今後チャンスがあれば疲労や外傷や疲労モデルを構築し、実際の治療的効果を観察して行きたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tamai Shinsuke, Fujita Shin-ichiro, Komine Ritsuko, Kanki Yasuharu, Aoki Kai, Watanabe Koichi, Takekoshi Kazuhiro, Sugasawa Takehito	4. 巻 608
2. 論文標題 Acute cold stress induces transient MuRF1 upregulation in the skeletal muscle of zebrafish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 59 ~ 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.03.093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sugasawa Takehito, Tome Yoshiya, Takeuchi Yoshinori, Yoshida Yasuko, Yahagi Naoya, Sharma Rahul, Aita Yuichi, Ueda Haruna, Maruyama Reina, Takeuchi Kaoru, Morita Shohei, Kawamai Yasushi, Takekoshi Kazuhiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Influence of Intermittent Cold Stimulations on CREB and Its Targeting Genes in Muscle: Investigations into Molecular Mechanisms of Local Cryotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4588 ~ 4588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21134588	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sugasawa, T, Yoshiya, T, Takeuchi, Y, Yahagi, N, Sharma, R, Aita, Y, Yoshida, Y, Tokinoya, K, Sekine, N, Takeuchi, K, Ueda, H, Maruyama, R, Morita, S, Kawamai, Y, Takekoshi, K	4. 巻 1
2. 論文標題 Influence of Intermittent Cold Stimulations on CREB and Its Targeting Genes in Muscle: Investigations into Molecular Mechanisms of Local Cryotherapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Preprints	6. 最初と最後の頁 1-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20944/preprints201904.0277.v1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 玉井伸典、藤田晋一郎、菅澤威仁、渡部厚一、竹越一博
2. 発表標題 Effects of Acute Cold Stress on Gene Expression in Skeletal Muscle of Zebrafish
3. 学会等名 the 27th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------