

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：35308
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22650133
 研究課題名（和文） PC12m3細胞を指標とした温熱と電気刺激併用による新しい物理療法の開発
 研究課題名（英文） The combination of heat and electrical stimulation induces neurite outgrowth in PC12m3 cells
 研究代表者
 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

研究成果の概要（和文）：

適度な温熱や電気刺激は神経突起の伸長を促進する。我々はPC12細胞からp38 MAPキナーゼ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MAPキナーゼ経路に変異をきたしたPC12m3細胞を開発した。この細胞を利用して神経突起形成メカニズムの解明を行い、神経突起形成に最適な温熱と電気刺激条件を求めた。PC12m3細胞に100mA以下の電流を40°Cで15分通電した時、良好な神経突起形成が認められた。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the role of the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in heat stress and electrical stimulation-induced neurite outgrowth of PC12 mutant cells in which nerve growth factor (NGF)-induced neurite outgrowth is impaired. When cultures of the PC12m3 cells were exposed to heat stress at 40 degrees C and electrical stimulation at 100 mA for 15 min, activity of p38 MAPK increased and neurite outgrowth was greatly enhanced. Longer heat treatment and electrical stimulation of PC12m3 cells provoked cell death.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	0	1,300,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	2,900,000	480,000	3,380,000

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：温熱、電気刺激、神経突起伸長、p38 MAPキナーゼ、PC12 m3細胞

1. 研究開始当初の背景

適度な温熱や電気刺激は神経突起の伸長を促進する。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細胞から古典的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 MAP キナーゼ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 MAP キナーゼ経路に変異をきたした PC12m3 細胞を開発した。この細胞を利用して神経突起形成メカニズムの解明を行い、神経突起形成に最適な温熱と電気刺激条件をそれぞれ求めた。p38MAP キナーゼの神経細胞における機能は不明であるが、PC12m3 細胞においては温熱や電気刺激によって非常に高い活性を示した。さらに MAP キナーゼの阻害剤を用いた実験からは ERK は神経突起形成に必ずしも必要でないことが判明した。これらの結果は、温熱や電気刺激は p38MAP キナーゼを活性化して神経細胞を活性化していることを示唆している。さらに p38MAP キナーゼは ERK によって活性化される転写因子の CREB を活性化することから電気刺激による神経突起形成は p38MAP キナーゼ系のみで誘導されることが示唆される。これまでの研究では温熱刺激については 44°C で 10 分間の刺激が最も有効であり、電気刺激条件に関しては、100mA で 30 分通電したものが最も神経突起形成が良好であった。

2. 研究の目的

温熱と電気刺激それぞれ単独で刺激した結果を人体に応用するとそれぞれが過大な負荷で苦痛を生じるものである。44°C で 10 分加温というのは熱すぎるし、100mA で 30 分通電というのも痛くて耐えられる刺激ではない。そこで、両者を併用すれば最適な刺激条件になるのではないかと考えた。すなわち実現可能な 40°C の温熱で人体が耐えうるレベルの通電で効果が得られるのであれば臨床応用可能である。

一方、変形性膝関節症をはじめとした近年問題となっている運動器疾患の物理療法としては温熱刺激と電気刺激のどちらも欠かせないものである。温熱刺激と電気刺激の単独作用については我々もこれまで研究を行ってきたが、両者の併用による作用を解析することで、従来存在しなかった極めて有効な物理療法が生まれてくる可能性がある。そこで、PC12m3 細胞を指標として温熱と電気刺激併用による最適な条件を求め、その基礎実験の成果を元に、温熱と電気刺激併用による新しい物理療法を変形性膝関節症患者に行い、その効果を検証した。

3. 研究の方法

実験に使用した PC12 細胞は、グリーンラ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。細胞は、10%ウマ血清と 5%牛胎児血清それに 80µg/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。

細胞への物理的刺激としては熱と電気を試みた。培養細胞への電気刺激のために細胞電気刺激装置を製作した(図 1)。熱処理は恒温槽を用い 40°C に保ち(図 2)、神経細胞に Nicolet Viking IV 筋電計(Nicolet Biomedical Inc., USA)を用いて 10mA と 100mA の電気刺激を 15 分行った。電気刺激は SEP の設定で 1ms の duration の矩形波を 10Hz で負荷した。物理的刺激を施した細胞は 7 日間培養後神経突起形成を測定した。



図 1. 細胞電気刺激装置



図 2. 恒温槽による温熱刺激

PC12m3 細胞を利用して温熱と電気刺激併用効果の最適な条件を求めた結果、100mA 以下の電流を 40°C で 15 分通電すれば良好な神経突起形成が認められることが判明した。そこで、温熱と電気刺激併用による新しい物理療法を変形性膝関節症患者に行い、その効果を検証した。対象は整形外科外来を受診し変形性膝関節症と診断された患者 33 人(男性 10 人、女性 23 人)である。被験者の年齢は 54 歳から 91 歳(75.8±7.7 歳)であった。被験者に対し週 3 回の頻度で 1 回 15 分の温熱と電気刺激併用の物理療法を行った。使用した機器は AUTO Tens PRO (HOMER ION) であり、水を含ませた温熱導子を 43°C まで温め、電気刺激を行った(図 3, 4, 5)。この治療を 1 ヶ月間継続して治療効果の判

定を行った。評価項目としては日本整形外科学会 OA 膝治療成績判定基準(JOA score)、変形性膝関節症患者機能評価尺度；JKOM (Japanese Knee Osteoarthritis Measure)、visual analogue scale(VAS)を使用した。

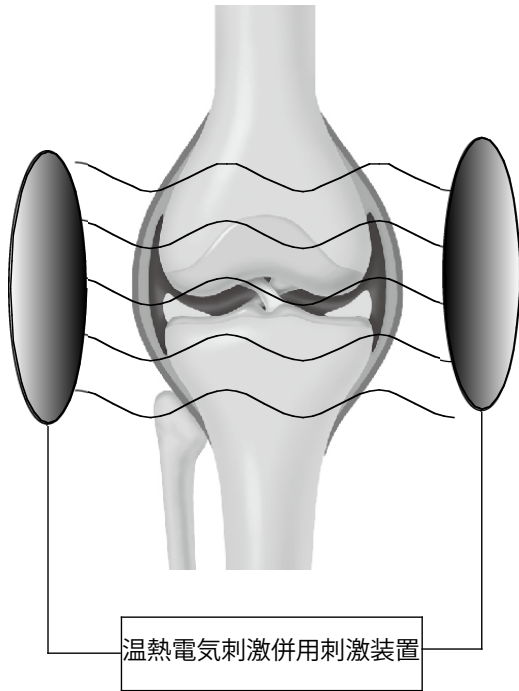


図 3. 温熱電気刺激併用刺激装置の概念図



図 4. AUTO Tens PRO 本体

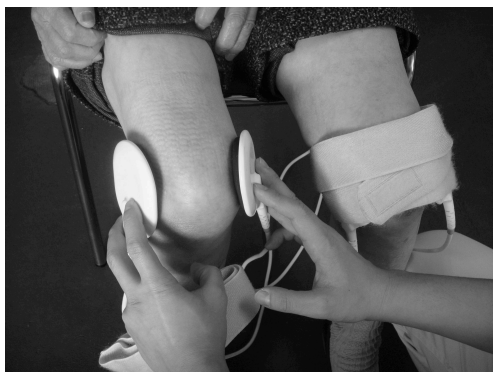


図 5. AUTO Tens PRO による温熱導子の設置

4. 研究成果

温熱と電気刺激併用では 40°Cの温熱刺激のみ 15 分では神経突起の形成は見られず(図 6)、40°Cで 15 分通電するという条件では 10mA では僅かな神経突起の形成率で(図 7)、100mA では良好な神経突起形成が認められたが一部の細胞は死滅した(図 8)。

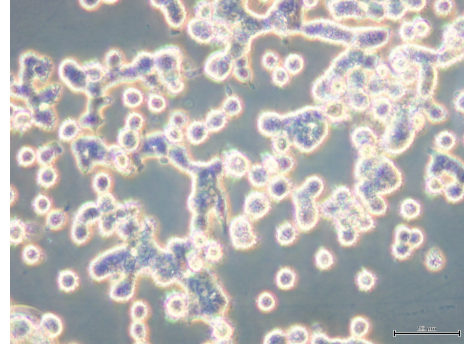


図 6. 40°Cの温熱刺激のみ 15 分

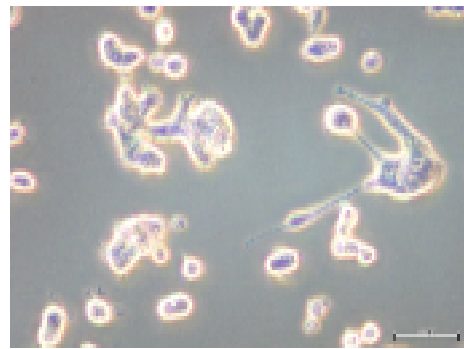


図 7. 40°Cの温熱+10mA の電気刺激 15 分

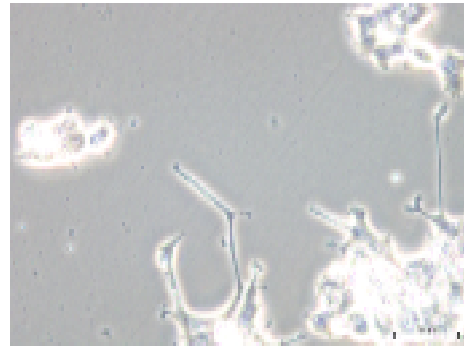


図 8. 40°Cの温熱+100mA の電気刺激 15 分

温熱と電気刺激それぞれ単独で刺激した結果を人体に応用するとそれぞれが過大な負荷で苦痛を生じるものである。しかし温熱と電気刺激併用では100mA以下の電流を40°Cで15分通電すれば良好な神経突起形成が認められるので臨床でも実施可能である。

温熱と電気刺激併用による新しい物理療法を変形性膝関節症患者に行い、その効果を検証した。温熱と電気刺激併用での効果は、痛みを生じる末梢神経修復の指標と考えられる VAS による自覚的疼痛の評価において処置前 5.31 ± 1.9 が 1 ヶ月経過後には 4.20 ± 2.1 に減少した。温熱と電気刺激の併用によって直接神経細胞に作用して末梢神経の修復再生メカニズムを引き出し変形性膝関節症の痛みを改善することができると考えられる。被験者の自覚的評価では、従来の電気治療よりも有効との回答がほとんどであった。全被験者において処置によって疼痛が増悪した者は現時点ではない。

従来、分子生物学的に物理刺激の効果を研究してきた成果として熱ショック蛋白質 (heat shock proteins HSPs) についての知見が有名である。我々はこうしたアプローチとは全く異なる方法で、痛みを生じる末梢神経の修復という観点から神経細胞そのものの分子生物学的な解析を行った。

研究手法の斬新さと比較すると温熱と電気刺激の併用というのは平凡な物理療法である。今回使用した AUTO Tens PRO のように、現在既に温熱導子を持つ電気治療装置が開発されている。この装置は水と温熱の作用で肌を蒸した状態にして皮膚の角質バリアを緩ませて通電効率を上げることを目的としている。しかし本研究で最終的に開発しようとしているのは、温熱と電気刺激の併用によって直接神経細胞に作用して末梢神経の修復再生メカニズムを引き出し変形性膝関節症等の痛みを治療する装置である。

現在、変形性膝関節症患者の治療の過程で得られた関節液を用いて関節軟骨の断片と炎症性サイトカインを定量する実験も行っており、自覚的な疼痛や機能の評価だけでなく、再生という観点から研究を進展させていく予定である。

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 3 件)

①河村顕治、変形性膝関節症における温熱と CKC 運動の効果、The Japanese Journal of Rehabilitation Medicine、査読無、Vol.47 No.12、2010、862-866

②河村顕治、加納良男、電気刺激による PC12m3 細胞の神経突起形成、吉備国際大学保健福祉研究所研究紀要、査読無、第 12 号、2011、13-18

③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、査読無、第 13 号、2012、27-30

[学会発表] (計 3 件)

①河村顕治、梅居洋史、山下智徳、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、第 23 回日本運動器科学会、平成 23 年 7 月 9 日、朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター

②河村顕治、PC12m3 細胞を指標とした温熱と電気刺激併用による疼痛改善のための神経再生の研究、第 48 回日本リハビリテーション医学会学術集会、平成 23 年 11 月 3 日、千葉市幕張メッセ

③河村顕治、筋電気刺激による荷重立位時ハムストリング機能の解析、第 49 回日本リハビリテーション医学会学術集会、平成 24 年 5 月 31 日、福岡国際会議場

[その他]

ホームページ等

<http://kawamura-md.jimdo.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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