

氏名	菅澤 威仁		
学位の種類	博士 (スポーツ医学)		
学位記番号	博甲第 7884 号		
学位授与年月	平成 28 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Effects of Cold Stimulations on Mitochondrial Function and VEGF Expression <i>in vitro</i> : Investigation of the Mechanisms of Cryotherapy (異なる温度の冷却刺激がミトコンドリア機能および VEGF の発現に及ぼす影響 - クライオセラピーにおけるメカニズムの探索 -)		
主査	筑波大学教授	博士 (体育科学)	前田 清司
副査	筑波大学准教授	博士 (医学)	向井 直樹
副査	筑波大学講師	博士 (医学)	野澤 大輔
副査	筑波大学教授	博士 (医学)	小林 裕幸

論文の内容の要旨

(目的) 本研究では、スポーツ外傷などに汎用されるクライオセラピーのメカニズムの探索として、異なる温度の冷却刺激が哺乳類細胞におけるミトコンドリア機能・新生および血管成長因子(VEGF)の発現に及ぼす影響を *in vitro* 実験系にて明らかにする事を目的とした。

(対象と方法) 本研究にて使用した細胞は、ヒト線維芽細胞(HF 細胞)、ヒト間葉系幹細胞(HMS 細胞)、ラット筋芽細胞(L6 細胞)の 3 種である。これらを十分に増殖させた後、それぞれの細胞を 6 well plate 5 枚に 5×10^5 cell/well となるように播種し 24 時間 37°C 下にて培養した。その後、0、4、17、および 25°C 刺激群、コントロール群に各 plate を振り分け(各群 n=6)、異なる温度の冷却刺激を 15 分間 3 セット行った(セット間には 15 分間、37°C にてインキュベートする工程を含む)。冷却刺激の方法は、各温度に設定された冷水上に培養プレートを浮かべる方法を用い、コントロール群のプレートは 37°C の恒温槽上に浮かべた。最後の冷却刺激終了後、37°C 下にて 24 時間インキュベートし、各項目を解析した。

ミトコンドリア機能は、主にミトコンドリアにて還元を受ける化合物の生成物であるレゾルフィンの蛍光強度(レザズリンアッセイ)、ATP 濃度、ミトコンドリア膜電位を反映する JC-1 色素の蛍光強度(JC-1 アッセイ)にて、ミトコンドリア新生はリアルタイム PCR 法によるミトコンドリア DNA(mtDNA)の相対量、ミトコンドリア特異的酵素である MnSOD の活性を測定する事により評価した。また冷却刺激 24 時間後

の培養液を用い、VEGF の発現量を ELISA 法にて測定した。さらに、各測定データの信頼性を増すために、冷却刺激後の全細胞数および細胞生存率をトリパンブルー法にて測定した。

各測定から得られた値を用いて、1 元配置分散分析を各細胞内で実施し、有意であることを確認した場合、多重比較検定を行った。多重比較検定は、等分散が仮定できる場合は Tukey's test を、できない場合は Dunnett's T3 test を用いた。なお有意確立 5%未満をもって有意差ありとした。

(結果) 3 つの細胞の 4℃刺激群において、レザズリンアッセイにて得られた蛍光強度、ATP 濃度、mitDNA の相対量および MnSOD 活性はコントロール群に比べ有意に高い値を示した。さらに HMS および L6 cells の 4℃刺激群において、JC-1 アッセイにて得られた蛍光強度はコントロール群と比べて有意に高い値を示した。

VEGF の発現量は L6 細胞の 4℃刺激群のみにおいて、コントロール群と比べ有意に高い値を示した。3 つの細胞の 17℃および 25℃刺激群において、ミトコンドリア機能・新生に関連する各項目の値がコントロール群に比べ有意に高値となる現象が多く認められたが、4℃刺激群ほど多くはなかった。一方 3 つの細胞の 0℃刺激群においては、ミトコンドリア機能・新生に関連する各項目の変化はあまり認められなかった。

3 つの細胞において、全細胞数および細胞の生存率は、各群間にて差を認めなかった。

(考察) 3 つの細胞の 4℃刺激群では、ミトコンドリア機能・新生に関連する多くの項目の値がコントロール群よりも有意に高い値を示し、17℃および 25℃刺激群では 4℃刺激群程ではないが高値となる現象が多くみられた。一方 3 つの細胞の 0℃刺激群においては、同項目の変化はあまり認められなかった。これらから、冷却刺激はミトコンドリア機能・新生を増大させる事が明らかとなったが、この現象を引き起こす至適温度が 4℃~25℃の間に存在すると強く推察される。ミトコンドリア機能、特に ATP 産生と損傷組織の修復には深く関わりがある事が先行研究にて明らかにされているため、組織の損傷部へクライオセラピーとして適応される冷却温度の違いは組織損傷の修復過程に異なる影響を与えることが考えられ、さらに冷却温度の管理が治療効果を上げるための重要な要素となる事が推察される。

L6 細胞の 4℃刺激群のみにおいて、VEGF の発現が有意に増加した。よって VEGF の発現に対しても至適温度が存在し、さらに細胞によっても冷却刺激への応答が異なると考えられる。VEGF も損傷組織の修復に深く関わりがある事が先行研究にて示されているため、筋損傷部に適応される冷却温度の違いは修復過程の違いを生むと考えられる。

3 つの細胞において、全細胞数および細胞の生存率は、各群間にて差を認めなかった。持続する冷却刺激は細胞に対し毒性を示す事が先行研究にて明らかにされているが、本研究にて実施した冷却様式は細胞に障害を与えることなく、ミトコンドリア機能・新生を増大させることが推察される。

審査の結果の要旨

(批評) 本論文は、異なる低温刺激による細胞の増殖と機能について検討したもので、低温刺激が細胞内のミトコンドリア機能を増大させ、血管内皮成長因子 (VEGF) の発現を促進することが示された。これは外傷後の冷却が生体におよぼす影響についての新たな知見につながる基礎データであり、一般に広く行われている冷却療法のメカニズム解明につながると考えられる。

審査様式 2 - 1

平成 28 年 1 月 7 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（スポーツ医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。