

〔博士論文概要〕

Effects of Cold Stimulations on Mitochondrial Function and VEGF Expression *in vitro*:

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-

平成 27 年度

菅澤威仁

筑波大学大学院人間総合科学研究科スポーツ医学専攻

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。

方法：

本研究にて使用した細胞は、ヒト繊維芽細胞(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、mtDNA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℃刺激群群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刺激温度が4℃付近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。

まとめ：

In vitro 実験系において、HF、HMS および L6 細胞に対する冷却刺激はミトコンドリア機能・新生を増大させることが明らかとなり、さらに、これらの応答には至適温度が存在することが強く示唆された。L6 細胞のみにおいては冷却刺激が VEGF の発現を増大させるが、この反応に対しても至適温度が存在することが示唆された。以上から、組織損傷部に適応されるクライオセラピーの温度管理は、治療効果を左右する重要な要素となる事が示唆された。