

細胞の三次元様増殖を指標とした 温熱療法の最適条件に関する研究

平上二九三 井上茂樹* 秋山純一 小池好久** 加納良男**

Heat Shock-Induced Three-Dimensional-Like Proliferation of Mouse Fibroblasts Mediated by Hydroxyapatite

Fukumi HIRAGAMI, Shigeki INOUE*, Junichi AKIYAMA, Yoshihisa KOIKE**, Yoshio KANO**

要 旨

本研究の目的は、三次元様増殖に温熱刺激が効果的に働く最適と最小量を示すことであった。C3H10T1/2 マウス線維芽細胞とハイドロキシアパタイトを混合し、設定温度が40℃・41.5℃・43℃・44℃・45℃、処理時間は2分間・10分間・15分間・20分間・30分間・45分間・60分間・90分間・180分間・360分間の温熱刺激を与えて10週間培養することにより三次元様増殖形成に必要な最小と最適な温熱量を調べた。その結果、三次元様増殖形成に必要な最小の温熱量は43℃2分間、また最適な温熱量は43℃10分間であった。43℃2分間は非処理対照の1.7倍、43℃10分間では3.7倍と非常に高い形成率となり、それぞれ有意差がみられた ($p < 0.05$)。また、40℃で90分間・180分間と41.5℃15分間および44℃10分間も対照群に比べ高い形成率であった。43℃10分間の温熱処理では1週間後に約80%がアポトーシスになっていた。ウエスタンブロット分析により43℃10分間の温熱処理によって p38 MAPK の活性化が明らかであった。これらの結果から、温熱刺激による三次元様増殖は p38 MAPK の経路を介していることが判明した。本研究結果は最適な温熱量を提示するものとして温熱療法の基礎となり、温熱療法の効果を細胞生物学的に示すための重要な知見になると考えられる。

キーワード：温熱刺激、線維芽細胞、三次元様増殖、最適条件

Key words : Heat treatment, Fibroblasts, 3D-like proliferation patterns, Optimal heat conditions

はじめに

温熱療法は理学療法やリハビリテーション医療において広く活用されている¹⁾。この温熱療法は、悪性腫瘍部だけに焦点をあて組織破壊作用により病巣そのものを取り除くハイパーサーミアとは異なる²⁾。温熱療法は病理学的に異常な組織に対して、生体の持っている本来の治癒能力を促すものである。したがって、温熱療法の研究は生体や組織レベルにおける生理学的変

化のみならず、細胞レベルにおける生物学な研究が重要となる。そこで温熱療法やハイパーサーミアにおいては、細胞自身の自動制御機能を活性化させるような最適な温熱条件の検討が求められている。

最近では、温熱療法に対する細胞生物学研究が盛んに行われるようになってきた³⁻⁸⁾。例えば、Flourら⁹⁾は軟骨細胞と骨芽細胞とに40℃で4日間という長時間にわたり加温したところ、両者の細胞ともにミトコン

吉備国際大学保健科学部理学療法学科
〒716-8508 岡山県高梁市伊賀町8

*吉備国際大学大学院保健科学研究科
〒716-8508 岡山県高梁市伊賀町8

**吉備国際大学保健科学部作業療法学科
〒716-8508 岡山県高梁市伊賀町8

Department of Physical Therapy, School of Health Science, KIBI International University
8, Iga-machi, Takahashi-city, Okayama 716-8508, Japan

*Graduate School of Health Science, KIBI International University
8, Iga-machi, Takahashi-city, Okayama 716-8508, Japan

**Department of Occupational Therapy, School Health Science, KIBI International University
8, Iga-machi, Takahashi-city, Okayama 716-8508, Japan

ドリアの活性と細胞増殖がみられる一方、生理学的に効果の違いがあることも報告している。つまり、細胞増殖を活性化するような細胞能力の解明から最適な温熱量、すなわち設定温度や刺激時間を確定する必要がある¹⁰⁻¹²⁾。

そこで我々は、温熱刺激を含むいろいろな物理刺激の効果を培養細胞と人工骨（ハイドロキシアパタイト、以下 HA）を用いて迅速に調べる方法を開発した^{13,14)}。すなわち、マウスの C3H10T1/2 を用い、機械的刺激やレーザー照射^{15,16)}を与え、あるいは電磁場刺激や超音波刺激^{17,18)}を与え HA と混合培養するとその周りを 200 μm 以上の幅で周りを囲んだ細胞群が出現し三次元様増殖が形成されるのである¹⁹⁻²¹⁾。本研究は、マウス線維芽細胞の HA を媒体とした三次元様増殖形成に温熱刺激が効果的に働き出す最小の温熱量（設定温度と刺激時間）および最適な温熱量を明らかにすることを目的とする。この三次元様増殖のメカニズムについては、温熱刺激により細胞外環境の変化が閾値に達した結果、遺伝子発現が起こり、細胞外マトリックスが多量に合成されたため形成されたのではないかと考えた。このことを確かめるために、あわせて温熱刺激に対する細胞応答について調べることにした。

対象および方法

1. 細胞と培養

線維芽細胞としては、C3H マウス胎児より分離された C3H10T1/2 細胞を使用する²²⁾。この細胞は不死化細胞ではあるが、他に何らガン細胞の形質をもっていないで正常細胞としてのふるまいを示し低い細胞密度のところ増殖を停止する。C3H10T1/2 細胞は、American Type Culture Collection (Rockvill, MD, 米国) より購入した。細胞は、10% 牛胎児血清と 80 μg /mL カナマイシンを含むイーグル BM 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・37°C で行い、培地交換は 3 日おきに行った。継代は、細胞が培養フラスコ (FALCON、25 cm²) 一杯 (10 日間培養で約 4 \times 10⁶/25cm²) になると、0.25% トリプシンで処理し 1/2 \times 10⁵個 (1:4 の希釈) を新しいフラスコに播きなおすという方法に

より行った。細胞は常時マイコプラズマ感染の有無を Hoechst 33258 で染色して調べ、感染のないことを確認して実験を行った。

2. HA 顆粒の準備

HA は神戸大学医学部の寺延らによって開発されたものを使用した。HA 粒子は湿式沈殿法で合成され、圧縮形成した後 1200°C で焼成された。焼結体は直径 500~1,000 μm の顆粒であった²³⁾。細胞親和性をもたせるために、Ca/P モル比が 1.65、Mg 含有量は 0.43% とし、30~200 μm の連続した微小気孔をもつ多孔体顆粒であった。HA (Hydroxyapatite [化学式 Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂]) 顆粒は、実験前に 100 個ずつ試験管に入れ、オートクレーブで 30 分間滅菌をほどこした。なお、HA はフラスコの中に無作為に分散し固まらないようにした。

3. 温熱処理の方法

温熱処理を加えたものと温熱処理をしなかったものについて細胞増殖の形態の違いがあるかを調べた。本研究で用いた温熱刺激装置は温水槽 (ヤマト社製, Water Bath Shaker Personal-II) を使用した。フラスコ一杯に増殖した C3H10T1/2 細胞をトリプシンで剥がし、同時に滅菌した HA 顆粒 100 個を加えて設定温度を 40°C、41.5°C、43°C、44°C、45°C とし、刺激時間を 2、10、15、20、30、45、60、90、180、360 分間として温浴槽で処理した。温熱刺激中はフラスコの蓋をきつく閉め周りをワックス紙で密閉した。フラスコ内部の培養液の温度は spot thermometer (ミノルタカメラ社製, TA-0510) で計測した。フラスコは温水槽に完全に浸し、熱平衡に達するまでに 1 分を要した。温熱刺激後は蓋をゆるめ温熱処理を加えなかったものと同様に CO₂ インキュベーター内で 10 週間静置し培養した。なお、コントロールは温熱処理をしなかったものと処理したもの、また HA を入れなかったものと入れたものの 4 群についてそれぞれ 3 回以上の実験を繰り返し行った。

4. 細胞の三次元様増殖

温熱処理による三次元様増殖の観察は、培養 1 週間

目から継時的に位相差顕鏡（ニコン社製、TMS-F）を用いて倍率40倍で行い、10週間観察した。三次元様増殖形成の標本は、走査顕微鏡（JEOL社製、JSM-5000LV）を用いて倍率150倍で行った。細胞がHAの周りを200 μm 以上の幅で囲んだ細胞群が出現したものを三次元様増殖として、すべてのHAについて観察してカウントし、さらに写真撮影を行った。三次元様増殖形成の割合は、フラスコに存在するHA100個の内、その周囲に200 μm 以上の三次元様増殖をもつものがいくつあるかを数え $\chi = (\text{三次元数}/100) \times 100$ として算出した。この実験ではHAの全周に形成されたものだけをカウントし、HAの周りに部分的に形成されたものも多数あったが、これらはカウントしなかった。

三次元様増殖の部分をパラフィンブロック作成し、その後、切片標本はスライド式マイクローム（サクラ社製、IVS-410）で薄切した。HAの周りの三次元様増殖を切片標本とし、三次元様増殖は細胞が増殖することで組織構造化されていることをHE染色で示す。

5. 熱ショックによるサバイバル実験

C3H10T1/2細胞に対し43 $^{\circ}\text{C}$ で2~20分間の熱ショックを与え1週間培養した後、0.2%のトリパンブルーで染めて生き残った細胞をカウントした。それぞれの値は3回行ったときの平均値と標準偏差を示す。

6. タネル染色によるアポトーシスの測定

アポトーシスを起こした細胞の検出とその量はタネル染色により調べた。タネル染色はTrevigen社製のTACS™ 2 TdT kitを用いて行った。細胞はチャンバースライドで温熱処理し24時間後に同所で染色し観察した。

7. p38 MAPキナーゼの検出とERKの検出

哺乳類の細胞に物理刺激が与えられると、その刺激に反応してERKやSAPK/JNK、p38 MAPキナーゼというMAPキナーゼファミリーを活性化することが分かっている²⁴⁾。活性化したp38キナーゼは免疫プロット法によって行った²⁵⁾。C3H10T1/2マウス線維芽

細胞100万個を25 cm^2 のフラスコに播き、10%ホースシーラムを含む培地で3日間培養し、その後、さらに0.5%のFBSを含む培地で48時間培養し、無血清条件下で30分間作用させて、44 $^{\circ}\text{C}$ で10分間と30分間の温熱刺激を与えてMAPキナーゼ活性を測定した。測定は細胞から全蛋白質を抽出し10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画後ポリビニールメンブレンにプロットした。プロットした蛋白質は、ホスホ p44/42MAPキナーゼ抗体またはホスホ p38抗体を作用させてリン酸化したMAPキナーゼ p38キナーゼの検出を行った。なお、三次元様増殖形成率が高かった温熱処理のものにp38 MAPキナーゼの活性を特異的に抑制するSB203580を加えて形成率への影響についても検討する。このSB203580はSigma (St. Louis, MO)社から購入した。

8. 統計解析

統計処理には、独立した測定を3回を行い、その平均値を代表値として、一元配置分散分析(ANOVA)を行って有意差を求めた後、多重比較検定に最小有意差法を適用し危険率5%をもって有意差ありとした。

結果

1. 温熱処理による三次元様増殖の形成

温熱処理後、10週間にわたって増殖形態を観察した。温熱処理後4週間目、三次元様増殖はまだみられないが、すでにHAを囲んで活発に増殖している細胞がみられた。5週間になると、三次元様増殖がいくつ観察されるようになってきた。6週間では、三次元様増殖がさらに大きくなり200 μm に達した。その後10週間まで観察を続けたが、それ以上の大きさにはならず、ほぼ一定の大きさを保った。細胞変性によって崩壊したものは除外しカウントしなかった。温熱処理をせずHAのみでも、三次元様増殖がわずかに誘導されるものが存在した。この結果より、温熱処理が三次元様増殖形成を促進することが示された(図1)。C3H10T1/2マウス線維芽細胞の特徴である細胞膜表面が滑らかで、フラスコ底面に薄く広がり増殖しているのが観察された。温熱処理をせず、HAを含み10週間培養しても細胞の形態的变化はみられなかった。し

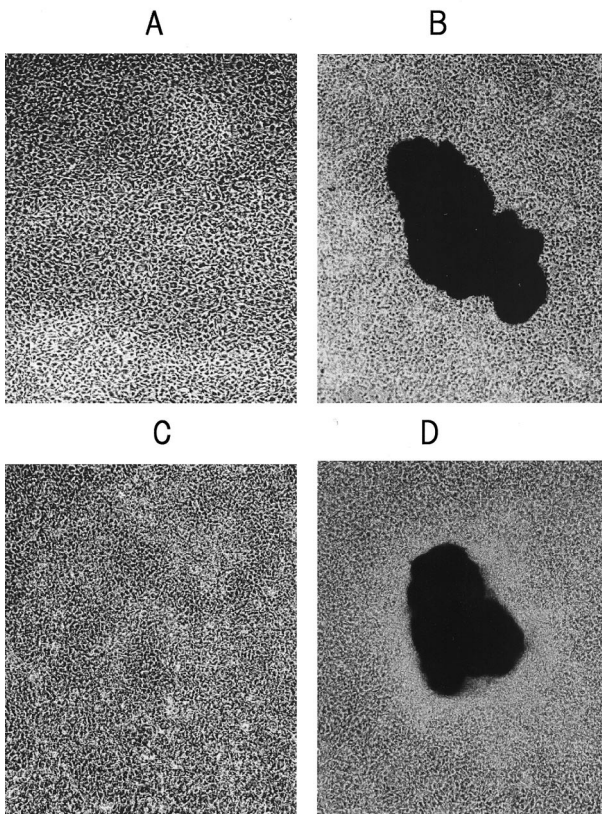


図1 HAを媒体としたマウス線維芽細胞の三次元様増殖形成

AとB: 温熱処理をせず、HAを含まずC3H10T1/2を培養したもの(A)とHAと混合培養したもの(B)、CとD: 温熱処理しHAを含まずC3H10T1/2を培養したもの(C)とHAと混合培養したもの(D)、温熱処理し、その後8週間経過したもの(CとD)および5週間経過したもの(AとB)(位相差顕微鏡像・倍率40倍)温熱処理したものに三次元様増殖が観察された。

かし、経時的に細胞がより密集してきた。

走査電子顕微鏡で観察したところ、三次元様増殖した細胞はHAの周りで何重にも重なって増殖しており、HAの壁をよじ登って増殖していた。また、HAに線維芽細胞の偽足がわずかに架橋形成しているのが見られる(図2-A)。一方、温熱刺激を与えたものはフラスコ底面からHAの下からよじ登りフレアー状に細胞増殖した細胞面が観察される(図2-B)。これに対しHAの表面形状は細胞に覆われることなく、多孔質に富み粗密である。三次元様増殖の切片標本を作ってみると細胞が何重にも重なって増殖していることが分かった(図3)。

2. 温熱処理による三次元様増殖形成率と経過

設定温度が41.5℃では、実験開始から4週間目まで

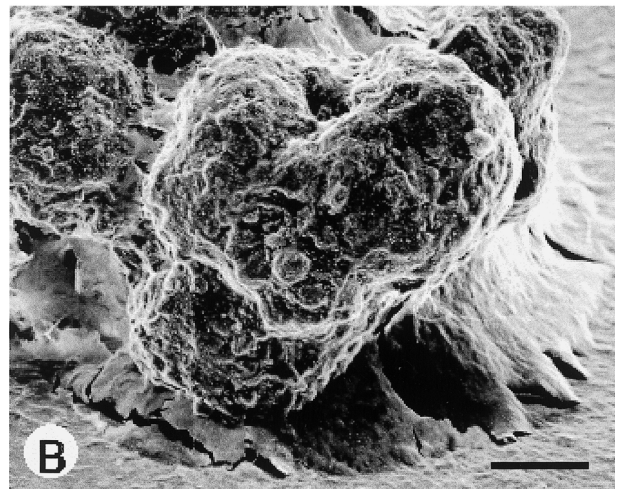
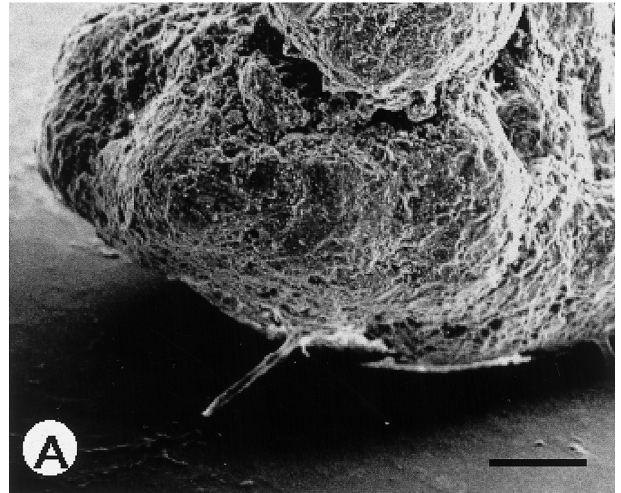


図2 C3H10T1/2細胞とHAを混合培養し温熱処理後10週間経過した走査顕微鏡による三次元様増殖像(倍率150倍)

温熱処理をしなかったもの(A)と温熱処理をしたもの(B)。Aは単層に増殖し、Bは立体的な増殖を示す。

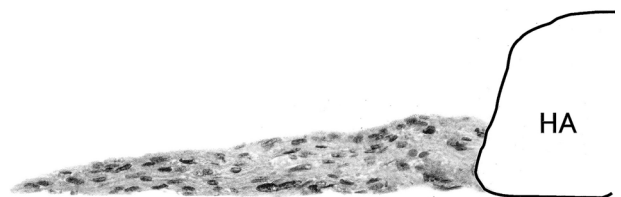


図3 温熱刺激によってHAの周りのC3H10T1/2細胞が重層し組織構造を示したイメージ像

三次元様の組織構造をパラフィンブロック作成し、薄切した後、HE染色を行った。生物顕微鏡を用いて倍率400倍で観察したところ、縦切した部分で基質化した細胞層を確認した。

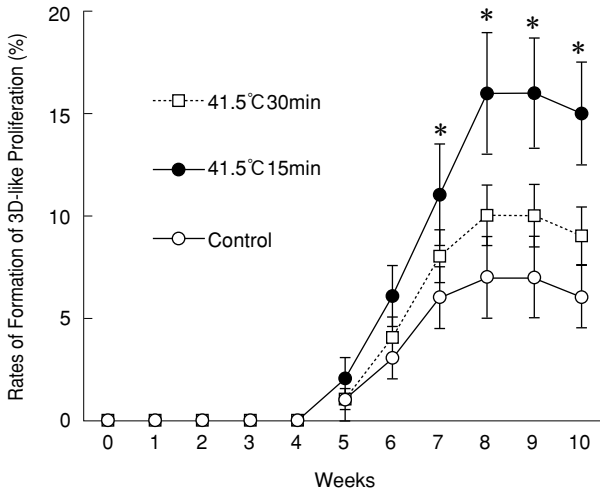


図4 41.5°Cで15分間(●)と41.5°C30分間(□)および温熱処理しなかったもの対照群(○)における三次元様増殖形成率の週ごとの経時的変化
細胞は100個のHA顆粒と混合培養され10週間観察した。

非処理対象はHAの周り細胞も含めて細胞全体に大きな変化はなかった。しかし、15分間処理と30分間処理においては、詳細に細胞を染色してみると、すでにアポトーシスを起こしている細胞がかなり観察されるなど、細胞にダメージが与えられたことが観察された。実験開始後6週間目の三次元様増殖形成率をみると、温熱処理をしなかった対照のものが $3.0 \pm 1.0\%$ であり、30分間処理のものは $4.0 \pm 1.0\%$ であった。一方、15分間処理のものが $6.0 \pm 1.5\%$ であり、急激な三次元様増殖の形成が観察された。実験開始8週間目になると、30分間処理では $10.0 \pm 1.5\%$ 、45分間処理では $5.0 \pm 1.0\%$ であり、非処理対照が $7.0 \pm 2.0\%$ の三次元様増殖の誘導となっていた。これらに対して15分間処理のものは $16.0 \pm 3.0\%$ で、高い三次元様増殖形成率であった。その後、10日目まで観察を続けたが、形成率はほぼ飽和状態となった(図4)。

3. 三次元様増殖を誘導する最適な設定温度と処理時間

はじめに設定温度が40°Cで20分間・60分間・90分間・180分間・360分間温熱処理し、実験開始8週間後の三次元様増殖形成を調べたところ、90分間処理が $14.0 \pm 2.0\%$ 、180分間処理が $24.7 \pm 5.0\%$ で非処理対照群に比べそれぞれ有意に高かった($p < 0.05$)(図5)。

次に設定温度が41.5°Cで15分間・30分間・45分間温

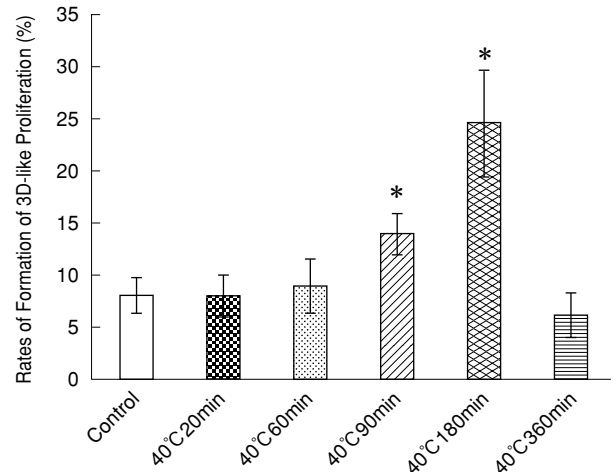


図5 温熱処理時間による三次元様増殖の誘導

40°Cで20分間、60分間、90分間、180分間、360分間処理および温熱処理しなかったもの対照群における8週間目の三次元様増殖形成率、90分間と180分間と処理のものが非処理対照に比べ有意に高い形成率を示した($*p < 0.05$)。

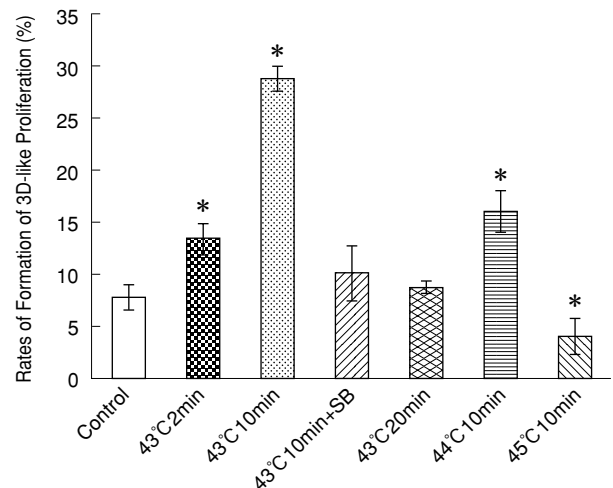


図6 43°Cで2分間処理と10分間処理と20分間処理、43°Cで10分間処理+SB203580、44°Cで10分間処理、45°Cで10分間処理および温熱処理しなかった対照群における温熱処理後8週間目の三次元様増殖の形成率(3回試行したときの平均値と標準偏差)

三次元様増殖形成率は43°Cで2分間処理と10分間処理および44°C10分間処理で非処理対照群に比べ有意に高い形成率となった($*p < 0.05$)。

熱処理し、8週間後の三次元様増殖形成率を調べた。これらの三次元様増殖形成率では15分間処理が $16.0 \pm 3.0\%$ で非処理対照群に比べ有意に高い形成率であった($p < 0.05$)(図4)。

さらに設定温度が43°Cの実験では2分間処理と10分間処理および20分間処理を行い、8週間後の三次元様

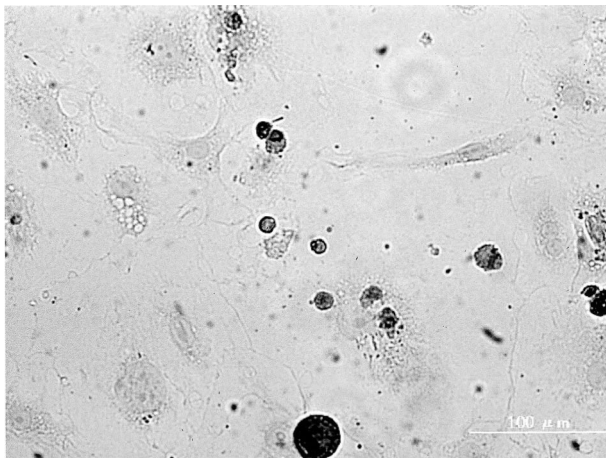


図7 正常細胞とアポトーシスを起こした細胞の形態観察

ガラスチャンバーで培養した細胞を43℃20分間で温熱処理を行い24時間培養した後の正常細胞とアポトーシスを起こした細胞を示した。細胞の形態は TUNEL 染色により検出し光学顕微鏡で観察した (×400)。

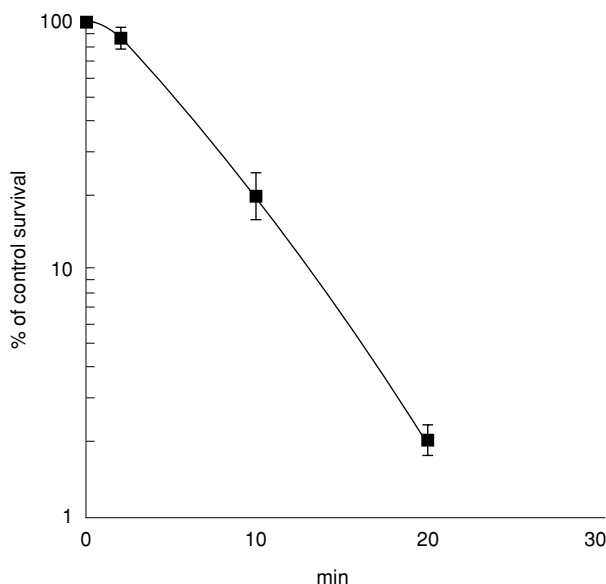
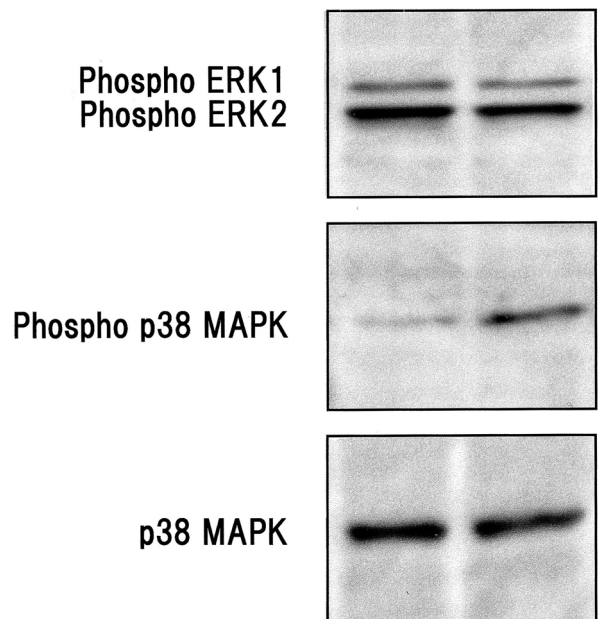


図8 C3H10T1/2 マウス線維芽細胞が生き残る温度の影響

細胞は43℃で2分間と10分間および20分間処理された後37℃に維持された。37℃のインキュベーターで静置培養し1週間後に各フラスコの細胞数を計測し、熱ショックに至らなかった細胞をパーセンテージで示した。それぞれの値は3回行ったときの平均値と標準偏差を示す。

増殖形成率を調べた (図6)。その結果、三次元様増殖形成率は非処理対照群が7.7±1.2%であり、2分間処理群のものは13.3±1.5%、10分間処理群のものが28.7±1.2%、20分間処理群のものでは8.7±0.6%の三次元様増殖形成率であった。このことから20分間処理群は非処理対照群の1.1倍誘導されているに過ぎな



control 43°C10min

図9 熱ショックによるC3H10T1/2 マウス線維芽細胞のp38 MAPキナーゼとERKの活性化

細胞に無血清下で温熱処理をしなかったものと43℃で10分間温熱処理したもので、活性化したp38 MAPキナーゼとERKの検出を行った。

かった。しかし、2分間処理群は非処理対照群の1.7倍、10分間処理群では3.7倍と非常に高い誘導率となり、非処理対照群に比較してそれぞれ有意差がみられた ($p < 0.05$)。しかし、p38 MAPKの活性を抑制するSB203580を43℃10分間のものに加えたところ、三次元様増殖形成はほぼ完全に抑制され形成率は10.0±2.6%であった。

最後の実験として44℃の設定温度で10分間処理のものは16.0±2.0%で非処理対照群に比べ有意に高かった。一方、45℃の設定温度で10分間処理のものは細胞死により有意に低かった。

以上の結果から、三次元様増殖の誘導に有意に高い温熱量は40℃90分間と180分間処理、41.5℃15分間処理および43℃2分間と10分間処理であった。

4. 熱ショックによる細胞死

43℃20分間の温熱刺激を与え24時間培養後に、約60%のアポトーシスを起こした細胞を形態観察したものを図7に示す。また、温熱刺激による細胞ダメージをサバイバルカーブとして示した (図8)。この結

果、43℃10分間で温熱処理したものについては、1週間後にはほぼ80%がアポトーシスになったが、43℃2分間のものではアポトーシスに至ったものは13%程度であった。

5. p38 MAP キナーゼと ERK の活性化

活性化した p38 MAP キナーゼと ERK の検出はウエスタンブロット法により行った。43℃10分間の温熱処理をしたものについて p38 MAPK の活性化が認められた (図9)。この結果より、p38 MAPK 経路が三次元様増殖形成に重要な役割を担っていることが示唆された。

考 察

皮膚の創傷治癒は線維芽細胞が、サイトカインである TGF- β などの刺激を受け、遺伝子発現により細胞外マトリックスを産生し、三次元構造の肉芽組織を形成し修復する。褥瘡部の肉芽組織の形成促進に、理学療法では紫外線や超音波刺激を用いる。また温熱療法の一つである赤外線刺激が、褥瘡や皮膚潰瘍などの創傷治癒に有効とされている。これらの *in vivo* における創傷治療に有効なエビデンスを確立するために、*in vitro* で培養線維芽細胞に種々の条件下で物理的刺激を与え、増殖の促進について検討することは重要と考える。近年、温熱刺激による細胞死やシグナルトランスダクションのしくみが明らかになり^{26,27)}、温熱処理は細胞をアポトーシスに導く細胞死と細胞増殖に導く生存のシグナルを同時に誘導していることが判っている^{28,29)}。われわれは、*in vitro* における創傷治療モデルを想定して、マウス線維芽細胞と HA を混合培養し、異なる条件で温熱処理を行い、三次元様増殖形成に及ぼす影響について調べた。

設定温度が40℃とした実験からは、比較的低温でも処理時間が長ければ三次元様増殖形成に有効であることが示された (図5)。一方、設定温度を41.5℃とした実験からは、処理時間が長ければ細胞死に作用することが示された (図4)。そして、設定温度が43℃で処理時間が2分間と10分間および20分間とした実験からは、2分間という短い処理時間でも温熱効果が始まっていることが示され、次いで10分間の処理時間が

三次元様増殖形成に最も有効であることが示された (図6)。しかし、それより少し長い処理時間の20分間になると効果は減少し細胞死へ影響することが判った。さらに、43℃以上の設定温度で同様の実験を試みたが、三次元様増殖の誘導に最適な設定温度は43℃であった。以上のことから、温熱刺激による三次元様増殖形成には、設定温度と処理時間との関連性が重要であることが示唆された。

本研究は、細胞が HA を足場にして、ふつうでは起こらない三次元の組織体を構成することに着目した。ふつうの条件下の培養では、この細胞は平たく単層に密集した増殖形態をとる。しかしながら、HA とこの細胞を混合し温熱刺激を与えて培養すると、パイルアップ増殖し HA 顆粒の周りを囲んで三次元様増殖が促進される。ここでは生体内でみられる三次元増殖とは違って、*in vitro* であることから区別する意味で三次元様増殖と表現している。この三次元様増殖は、温熱刺激により細胞外環境の変化が閾値に達した結果、遺伝子発現が起こり、細胞外マトリックスが多量に合成されたことにより形成されたのではないかと考えた。

そこで、HE 染色を行い、細胞によって三次元様増殖が形成されたことを確認した (図3)。この結果から温熱刺激によるダメージからの回復が三次元様増殖形成に働いたものと考えられる。本研究結果から、細胞レベルから効果的な温熱療法の適用量を決定するための有用性が示唆された。また、最近ヒトの線維芽細胞でも同様の実験を試みている。この研究からマウス線維芽細胞の HA を媒体とした三次元様増殖形成が、温熱刺激の最適条件を示すパラメータになることが判った。本研究結果は最適な温熱量を提示するものとして温熱療法の基礎となり、温熱療法の効果を細胞生物学的に示すための重要な知見になると考えられる。

本研究では、マウス線維芽細胞に熱ショックを与え生存率を調べる実験を行った。43℃20分で温熱処理したのものでは1週間後98%がアポトーシスに至った (図8)。43℃20分で温熱処理したものについては、実際に培養1週間後に詳細に細胞を染色してみたところ、アポトーシスがかなり観察されるなど細胞にダメージが与えられたことが観察された (図7)。40℃

10分および40℃180分では、いずれも温熱処理後1週間目に50%程度がアポトーシスとなっていた。40℃180分で温熱処理したものについても、実際に培養1週間後に詳細に細胞を染色してみたところ、アポトーシスがかなり観察されるなど細胞にダメージが与えられたことが観察された。

三次元様増殖の誘導に最適な温熱処理は43℃10分間であった。43℃で10分間という最適な温熱量が与えられた細胞は、ダメージを克服するという細胞反応が三次元様増殖形成に働いたものと考えられた。高温にさらされると細胞応答として Hsp70や Hsp27および Akt のような熱ショックタンパク質の合成が誘導される^{26,30)}。ストレス誘導 MAP キナーゼファミリーの一つである p38 MAPK は、熱ストレスが引き金となって発現される熱ショックタンパク質として主要なものである^{7,27,31)}。最近ではいろいろな物理刺激は p38 MAPK の経路を介して反応を起こしていることが明らかになっている⁷⁾。このことから p38 MAPK のシグナル伝達を介して細胞外マトリックスが形成されることにより、三次元様構造が作られることも推察される。ウエスタンブロット分析により43℃で10分間の温熱刺激によって明らかに p38 MAPK の活性化がみられた (図9)。p38 MAP キナーゼ阻害剤である SB 203580によって三次元様増殖形成は強く抑制されることも調べた (図6)。p38 MAP キナーゼの一種である ERK については三次元様増殖形成に必ずしも必要でないことが判明した。

三次元様増殖の大きさの幅については、週を追うごとにだんだんと大きくなり500 μ m に達するものもみられたが、一般に300 μ m を超えると変性して崩壊してしまう傾向にあった。この細胞変性によって崩壊したものは、除外しカウントしなかったが200 μ m が平均的であったのでこの幅に決めた。また、三次元様増殖の形成速度と形成率に一定性を出すために HA の大きさを500~600 μ m に揃えた。すべての HA に三次元様増殖がみられない理由は不明であるが、部分的にパイルアップするものがみられ、HA の場所によっては遺伝子発現しないことが推測された。三次元様増殖形成に関与した一連の遺伝子発現がなされたとき細胞は、三次元様増殖を示すと考えられる。

温熱療法に有効な温熱刺激は結合組織の分裂を促進するが、一方のハイパーサーミアで用いられる温熱刺激はがん細胞の分裂を阻害しアポトーシスを誘導する。両者の温熱療法に対する細胞反応は、温熱量の設定が極めて大切となり、結合組織とがん細胞とは反応が異なる。本研究は、温熱療法に有効な温熱量について示しているが、一方のハイパーサーミアにも示唆を与えるものと考えられる。

以上まとめると三次元様増殖に関する培養実験は、温熱量を敏感に反映していた。三次元様増殖形成に最適な温熱量は、43℃10分間であった。細胞レベルでの適用量は、温熱療法で最も効果的な温熱量とほぼ一致した。このことから、細胞の増殖活性を高めるための最適な温熱量の測定法として有用性が示唆された。

謝 辞

本研究は平成17年度学内共同研究費ならびに17年度科学研究費補助金基盤研究C (研究課題番号17500384) の助成を受けて行いました。ここに付記して深く感謝の意を表します。

Abstract

The aim of this study was to determine the minimal conditions in which heat treatment is effective for and the optimal heat conditions for enhancing three-dimensional (3D)-like cell proliferation. C3H10T1/2 mouse fibroblasts were cultured with hydroxyapatite granules for 10 weeks after heat treatment at 40, 41.5, 43, 44 or 45℃ for 2, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 180 and 360 min. Then minimal and optimal conditions of temperature and duration of heat treatment for induction of 3D-like proliferation of cells were determined. The minimal conditions of heat treatment to induce 3D-like proliferation were 43℃ for 2 min and the optimal conditions were 43℃ for 10 min. The mean rates of formation of 3D-like proliferation patterns by cells heat treated at 43℃ for 2 and 10 min were significantly higher (1.7- and 3.7-fold higher, respectively) than that by untreated cells ($p < 0.05$). We also observed significantly greater effects of heat treatment on 3D-like proliferation at 40℃ for 90 or 180 min and at 41.5℃ for 15 min and 44℃

for 10 min. We found that apoptosis had occurred in almost 80% of cells at one week after heat treatment at 43°C for 10 min. Western blot analysis demonstrated that phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) was markedly increased by heat treatment at 43°C for 10 min. These findings suggest that activation of p38 MAPK by heat shock is associated with 3D-like cell proliferation. The results of this study should be useful for further studies aimed at elucidation of the physiologic mechanisms underlying thermotherapy and hyperthermia.

文 献

- 1) Schutt A (1977) Physical medicine and rehabilitation in the elderly arthritis patient. *J Am Geriatr Soc* 25 : 76-82
- 2) Oleson J R, Gerner E W (1982) Hyperthermia in treatment of malignancies. In "Therapeutic Heat and Cold" Lehmann J F (ed) Waverly Press, Baltimore p 603-635
- 3) Parker J E, Winters W O (1992) Expression of gene specific RNA in cultured cells exposed to rotating 60-Hz magnetic fields. *Biochem Cell Biol* 70 : 237-241
- 4) De Deyne P G, Kirsch-Volders M (1996) *In vitro* effects of therapeutic ultrasound on the nucleus of human fibroblasts. *Phys Ther* 76 : 78-79
- 5) Kokubu T, Matsui N, Fujioka H et al (1999) Low intensity pulsed ultrasound exposure increase prostaglandin E2 production via the induction of cyclooxygenase-2 mRNA in mouse osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 256 : 284-287
- 6) Sun W J, Chiang H, Fu Y D et al (2001) Exposure to 50 Hz electromagnetic fields induces the phosphorylation and activity of stress-activated protein kinase in cultured cells. *Electro- and magnetobiol* 20 : 415-423
- 7) Jiliang Z, Gengdong Y, Jingsong Z et al (2002) CREB DNA binding activation by a 50-Hz magnetic field in HL60 cells is dependent on extra- and intracellular Ca²⁺ but not PKA, PKC, ERK, or p38 MAPK. *Biochem Biophys Res Commun* 296 : 1013-1018
- 8) Jonathan H, Martyn L, Pauline M et al (2002) Pulsed short-wave diathermy effects on human fibroblast proliferation. *Arch Phys Med Rehabil* 83 : 832-836
- 9) Flour M-P, Ronot X, Vincent F et al (1992) Differential temperature sensitivity of cultured cells from cartilaginous or bone origin. *Biol Cell* 75 : 83-87
- 10) Brown T D (2000) Techniques for mechanical stimulation of cells *in vitro* : a review. *J Biomech* 33 : 3-14
- 11) Kubo T, Arai Y, Takahashi K et al (2001) Expression of transduced Hsp70 gene protects chondrocytes from stress. *J Rheumatol* 28 : 330-335
- 12) Linda J S, Matthew J S (2001) What's new in orthopedic research. *J Bone & Joint Surg* 83 : 1117-1124
- 13) 平上二九三 寺延治 三宅信一郎 他 (1998) 運動刺激による線維芽細胞の人工骨媒体三次元様増殖. *J Hard Tissue Biology* 7 : 21-24
- 14) 平上二九三 加納良男 (2002) 物理刺激による線維芽細胞の人工骨媒体三次元様増殖. *リハ医学* 39 : 229-295
- 15) Hiragami F, Kano Y (2003) Formation of hydroxyapatite-mediated three-dimensional structures by mouse fibroblasts in response to physical stimulation. *Tissue Eng* 9 : 357-364
- 16) 平上二九三 加納良男 (2004) マウス線維芽細胞と人工骨の混合培養による三次元様増殖を指標とした機械的刺激の効果. *総合リハ* 32 : 261-266
- 17) Hiragami F, Teranobu O, Miyake S et al (2002) Formation of hydroxyapatite mediated three-dimensional structures by mouse fibroblasts due to electromagnetic field and ultrasonic waves stimulations. *Tiss Cult Res Commun* 21 : 101-107
- 18) 平上二九三 秋山純一 小池好久 他 (2003) 電磁場刺激による線維芽細胞の合成ハイドロキシアパタイトを媒体とした三次元様増殖. *吉備国際大学保健科学部研究紀要* 8 : 71-77
- 19) 平上二九三 秋山純一 小池好久 他 (2004) 培養細胞と人工骨による三次元様増殖形成を指標と

- した温熱療法の効果. 吉備国際大学保健科学部研究紀要 9 : 97-104
- 20) 平上二九三 井上茂樹 秋山純一 他 (2004) 細胞の三次元様増殖をパラメータとした温熱刺激の最適条件に関する研究. 日本物理療法学会会誌 11 : 11-17
- 21) Hiragami F, Akiyama J, Koike Y et al (2005) Enhancement of hydroxyapatite-mediated three-dimensional-like proliferation of mouse fibroblasts by heat treatment: Effects of heat shock-induced p38 MAPK pathway. *J Biomed Mater Res* 74 : 705-711
- 22) Reznikoff C A, Brankow D W, Heidlberger C (1973) Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to post confluence inhibition of cell division. *Cancer Res* 33 : 3231-3236
- 23) Kurioka K, Umeda M, Teranobu O et al (1999) Effect of various properties of hydroxyapatite ceramics on osteoconduction and stability. *Kobe J Med Sci* 45 : 149-163
- 24) Thomas V, Hansen O, Rehfeld J F et al (2000) Cyclic AMP-induced neuronal differentiation via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurochem* 75 : 1870-1877
- 25) Sakai T, Furuyama T, Ohoka Y et al (1999) Mouse semaphorin H induces PC12 cell neurite outgrowth activating ras-mitogen-activated protein kinase signaling pathway via Ca²⁺ influx. *J Biol Chem* 274 : 29666-29671
- 26) Phang D, Joyce E M, Heikkila J J (1999) Heat shock-induced acquisition of thermotolerance at the levels of cell survival and translation in xenopus A6 kidney epithelial cells. *Biochem Cell Biol* 77 : 141-151
- 27) Tacchini L, Dansi P, Matteucci E et al (2001) Influence of proteasome and redox state on heat shock-induced activation of stress kinases, AP-1 and HSF. *Biochim Biophys Acta* 1538 : 76-89
- 28) Eliopoulos A G, Gallagher N J, Blake S M S et al (1999) Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J Biol Chem* 274 : 16085-16096
- 29) Assefa Z, Vantieghem A, Declercq W et al (1999) The activation of the c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways protects HeLa cells from apoptosis following photodynamic therapy with hypericin. *J Biol Chem* 274 : 8788-8796
- 30) Mearow K M, Dodge M E, Rahimtula M et al (2002) Stress-mediated signaling in PC12 cells: the role of the small heat shock protein, Hsp27, and Akt in protecting cells from heat stress and nerve growth factor withdrawal. *J Neurochem* 83 : 452-462
- 31) Dwyer D S, Liu Y, Miao S et al (1996) Neuronal differentiation in PC12 cells is accompanied by diminished inducibility of Hsp70 and Hsp60 in response to heat and ethanol. *Neurochem Res* 21 : 659-666