

熱ショックと平面絹による培養細胞の増殖形態の変化

平上二九三 元田弘敏* 井上茂樹** 秋山純一
小池好久*** 竹澤俊明**** 高林千幸**** 加納良男***

Heat Shock-Induced Changes of Proliferation Pattern in Normal Human Cells Mediated by Pressed Silk

Fukumi HIRAGAMI, Hirotoshi MOTODA*, Shigeki INOUE**, Junichi AKIYAMA,
Yoshihisa KOIKE***, Toshiaki TAKEZAWA****, Chiyuki TAKABAYASHI****, Yoshio KANO***

要 旨

われわれは、マウス細胞とハイドロキシアパタイトによる三次元様増殖の形成率を指標として物理療法の適用量を示してきた。本研究では平面絹を用いて温熱刺激による正常ヒト細胞の増殖形態の変化を調べた。マウス細胞の実験で温熱刺激の最適量が43℃10分であったことから同様の温熱処理を行った。その結果、三次元様増殖は「きざし」「出来かけ」「ほぼ形成」「形成」という段階的な形成過程があることが判った。またハイドロキシアパタイトの実験に比べ、平面絹を用いた実験では三次元様増殖が早期に形成され、かつ高い形成率となった。正常ヒト細胞においても三次元様増殖の再現性が確認されたことは、ヒトの生体内における細胞機能に直接結びつく成果として期待される。さらに三次元様増殖形成を4期に区分した指標は、適用量の決定に有用であると推察された。本稿では平面絹による正常ヒト細胞の増殖形態の変化を、先のマウス細胞の研究結果と比較検討し、あわせて三次元様増殖形成のメカニズムを分子生物学的に検討した。このことから p38の作用に合わせて特に Hsp70・Hsp47・Hsp27が重要な働きをしていると考えた。

キーワード：温熱刺激、正常ヒト細胞、平面絹、増殖形態

Key words：Heat treatment, Normal human cells, Pressed silk, 3D-like proliferation patterns

はじめに

リハビリテーション（以下、リハ）医学は障害のある身体に外部刺激を与え、生体が本来備えている自然治癒力を促し機能回復を促進するものである。一般に適度な外部刺激は身体機能の維持向上を図るものの、弱い刺激では効果はなく、強すぎる刺激は逆に機能障害をきたすことが知られている。身体の機能回復を促

進する適度な刺激量は、細胞自身の生理的活性を高めると考えられ、細胞機能を活性化するような適用量を踏まえておくことは重要である。障害の機能回復に有効な治療量は、細胞の損傷と修復といった回復メカニズムの解明からも示されるべきであり、リハ医学で用いるいろいろな治療法の効果は細胞レベルで検証することが重要である。しかし、刺激強度や治療時間およ

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

*岡山大学大学院自然科学研究科
〒710-0046 倉敷市中央二丁目20-1

**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

****独立行政法人 農業生物資源研究所
〒305-0901 茨城県つくば市池の台 2

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

*Research Institute for Bioresources, Okayama University
20-1, 2-Choume, chuo-Chou, Kurashiki-city, Okayama 710-0046, 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

****National Institute of Agrobiological Sciences
2, Ikenodai, Tsukuba, Ibaraki 305-0901, Japan

び頻度などといった適用量についてはあいまいで直接証明したものは乏しく、細胞機能を促進する有効な刺激量について調べた研究はあまりみられない。今後、リハ効果の高い適用量を定めるため、分子生物学的な研究成果を臨床応用することが待たれている¹⁾。特に最近では、リハ医療の“質”に加えて“効率性”が問われ、科学的なエビデンスや効果判定に社会の厳しい目が向けられており基礎研究の成果が求められている。

われわれは、マウス線維芽細胞と人工骨のハイドロキシアパタイト (Hydroxyapatite、以下 HA) による三次元様増殖の形成率を指標として物理療法の最適条件を検討してきた²⁻⁶⁾。あわせて三次元様増殖形成のメカニズムを解明するため、p38 MAPK 経路の関連遺伝子を調べ分子生物学的検討も行っている⁷⁾。前者の実験から物理療法の適用量を細胞レベルで提示するとともに、後者の実験においては刺激に対する様々な細胞の防御機能が関与し、損傷からの回復が三次元様増殖に働いたと考えそのメカニズムを検討している。

本研究では両者の実験をさらに進展させるため、各種物理療法のうち温熱療法に焦点をあて、マウス細胞での実験に正常ヒト線維芽細胞を用いた実験を加える。また HA のみならず新しい媒体として平面形状で強度に優れ靱帯や腱などの結合組織を再構築するために開発された絹糸構造物 (以下、平面絹) を用いる⁸⁾。つまり、温熱刺激による平面絹を媒体とした正常ヒト細胞の三次元様増殖について調べていく。

本稿では、正常ヒト細胞と平面絹による三次元様増殖の実験を行い、先のマウス細胞の HA の研究成果と比較し今後の研究の展開について考察する。本研究では増殖形態の変化を詳細に観察し、温熱刺激の適用量とそのメカニズムを分子生物学的に検討することを目的とした。

対象および方法

1. 細胞と培養

本研究で用いた細胞は、正常なヒトの新生児包皮から採取し、純粋の皮膚線維芽細胞として分離された初代培養のものであった。この新生児包皮由来線維芽細胞は、倉敷紡績株式会社より購入した。培地は10%牛

胎児血清とイーグル MEM (ニッスイ) 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℃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, 25cm²) 一杯 (10日間培養で約4×10⁶/25cm²) になると、0.25%トリプシンで処理し1×10⁵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で行った。

2. 平面絹の準備

繭糸 (シルク) は古くより手術用縫合糸として使用され、優れた強度と安全性を有した天然物由来素材である。繭糸を平面状に加工し、絹糸構造物の担体として精製された平面絹 (独立行政法人・農業生物資源研究所の竹澤・高林らによって開発されたもの⁸⁾) を使用した。滅菌は平面絹をほぼ0.5mm 四角と0.5×2.0 mm 角に切った後、70%エタノールに1週間浸けておき、その後100%エタノールに入れ気化させ乾燥させた。

3. 温熱処理の方法

先のマウス細胞の実験に比べ、正常ヒト細胞の温熱処理による増殖形態に違いがあるかを調べた。温熱刺激装置は、温水槽 (ヤマト社製、Water Bath Shaker Personal-II) を用いた。温熱処理は、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。フラスコ一杯に増殖したヒト線維芽細胞をトリプシンで剥がし、同時に滅菌した平面絹100枚を加えて混合培養した。これまでの実験結果から温熱刺激による三次元様増殖形成率の最適量は、43℃10分間であったことから同様の温熱処理を行った。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。予備実験でフラスコを温浴槽に浸し、熱平衡に達するまでの時間を求めた。たとえば43℃10分間の場合、3 ml の培地が入ったフラスコを44.3℃の温浴槽に浸け、3分後に43℃の熱平衡に達したことから計13分間浸した。温熱刺激後は、蓋をゆるめ温熱刺激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週間静置培養した。

結 果

1. 増殖形態の観察

温熱処理後、10週間にわたって増殖形態を位相差顕微鏡（対物レンズ5倍）で観察した。正常ヒト細胞と平面絹（ほぼ0.5mm角のものを使用）の実験では培養1週目で、ほとんどの平面絹が細胞シートに結合し、浮遊しているものは極わずかであった。培養2～4週目には、細胞シートに結合した平面絹の周囲の一部に細胞の重層が確認できるものが多数観られ、三次元様増殖の“きざし”のものが観られた。4～6週目には、平面絹のほぼ全周を囲んで重層しているものの全周に至っていない、三次元様増殖の“ほぼ形成”されたものが観られた。4～7週目では、平面絹の全周を完全に囲んで重層した三次元様増殖“形成”のものが多く観られた（図1）。この結果から三次元様増殖が形成される5週目までの増殖形態の変化が、温熱刺激の適用量を反映していることが示された。また、5週目以降から10週目は平面絹の総数に対する“形成”の割合が指標になることが判った。

2. 増殖形態の規定

平面絹（ほぼ0.5×2.0mm角のものを使用）を用いて温熱処理後、5週間にわたって増殖形態が変化した長さを計測した。実験開始2週目では“きざし”のものが、また3週目では平面絹の半周以上を囲んで重層した三次元様増殖の“出来かけ”のものが多く観察された。4週目では平面絹周囲の一部に重層を欠いている“ほぼ形成”のものが観られ、また平面絹の全周を完全に囲んでいる“形成”のものも観られた。このことから実験開始5週までの増殖形態の変化を実測することは温熱刺激の適用量の指標になることが示唆された（図2）。

すなわち三次元様増殖の形成過程として「Ⅰ：きざし」「Ⅱ：出来かけ」「Ⅲ：ほぼ形成」「Ⅳ：形成」の4段階を指標と定めた。したがって、その規定をⅠ：きざし；細胞シートに結合し平面絹の周囲の一部に重層が観られるもの、Ⅱ：出来かけ；平面絹の周囲を半周以上（ $1/2 \sim 3/4$ 未満）囲んで重層したもの、Ⅲ：ほぼ形成；平面絹のほぼ全周（ $3/4$ 以上・一部欠損がある）を囲んで重層したもの、Ⅳ：形成；平面絹の全周を完全に囲んで重層したもので三次元様増殖

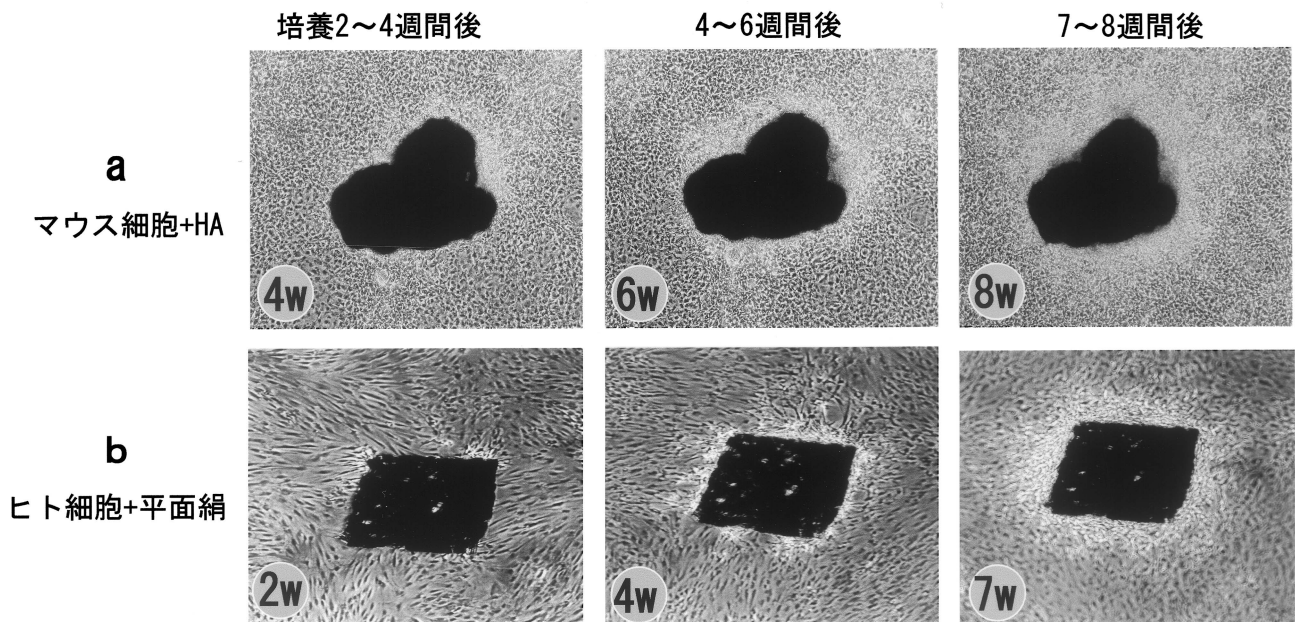


図1 マウス細胞（HA）の実験および正常ヒト細胞（平面絹）の実験における増殖形態の変化

真ん中の黒いものがHAおよび平面絹で、その周りにある小さな粒状のものがマウスおよび正常ヒト細胞である。黒色の担体の縁で白く光って見えるのが細胞の立体的な増殖、すなわち三次元様増殖である。温熱処理後4週目、三次元様増殖はまだみられないが、すでにHAおよび平面絹を囲んで活発に増殖している細胞がみられた。その後、三次元様増殖が増え、8週目まで大きくなり10週間まで観察が続けたが、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。マウス細胞は4，6，8週目の増殖形態の変化を表し、正常ヒト細胞においては2，4，7週目の増殖形態の変化を示した。

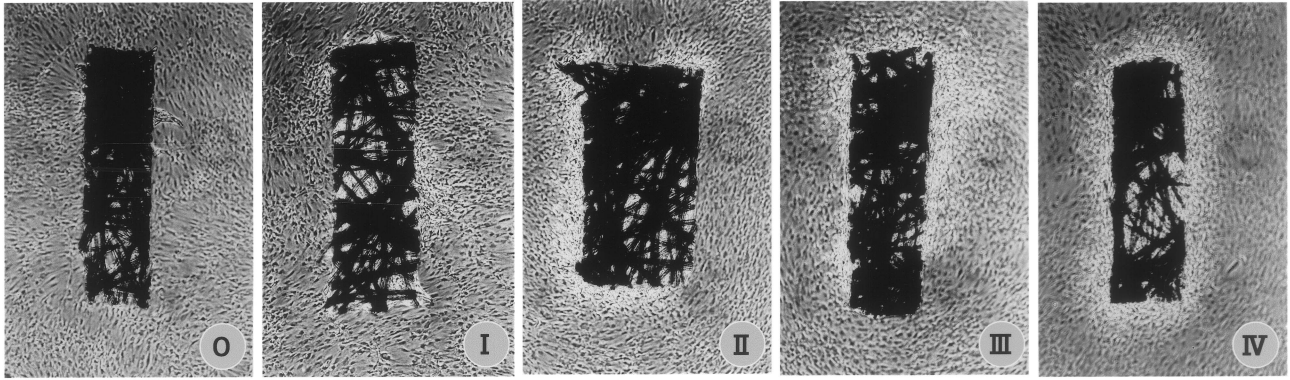


図2 正常ヒト細胞（平面絹）の実験における増殖形態の変化

温熱処理後4週目の様々な増殖形態の写真を示す。平面絹の外周で細胞の重層した長さを計測し、平面絹の全周長で除し三次元様増殖形成の割合を求めた。その結果、O：0%、I：23%、II：67%、III：83%、IV：100%であった。

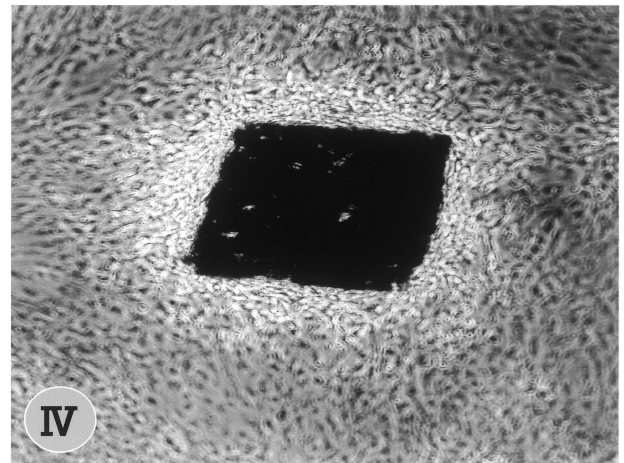
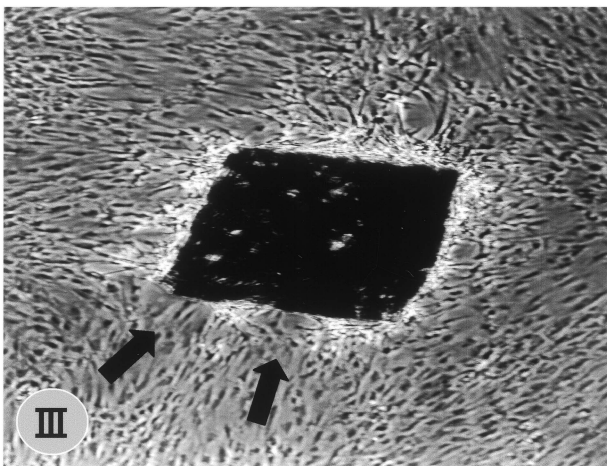
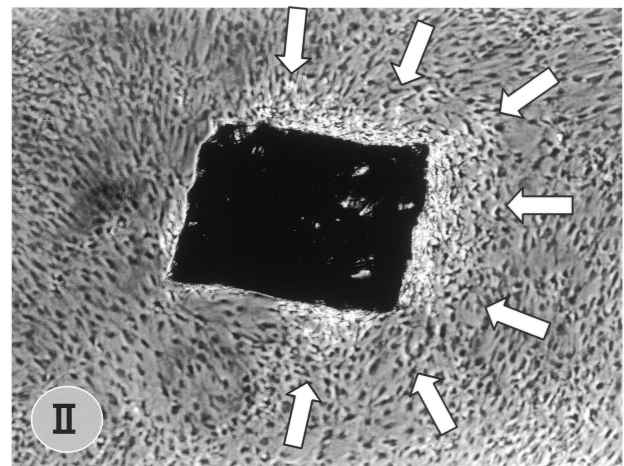
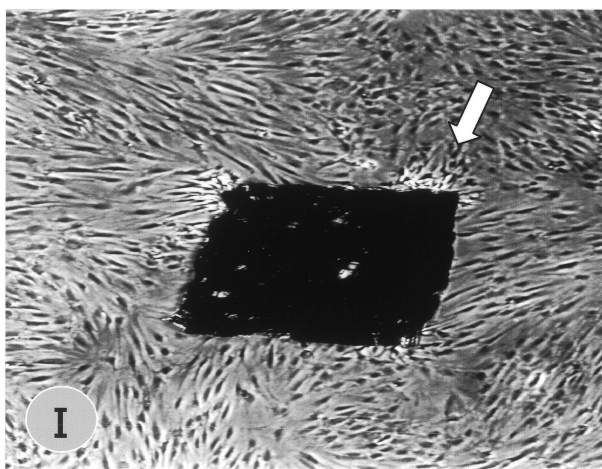


図3 正常ヒト線維芽細胞と平面絹による増殖形態の変化

白の矢印は重層した部位を指し、黒の矢印は重層していない部位を示す。

形成とした（図3）。

3. 三次元様増殖形成率の経過

三次元様増殖形成の経過観察より I から IV の段階に区分された4つの指標が示されたが、次にIVの形成率

を調べるため、ほぼ0.5mm角の平面絹を用いて温熱処理後、10週間にわたって観察した。2週目ではⅢ：ほぼ形成のものが僅かに観られたものの、次の3週目からⅣ：形成が25%、その後4週間目では36%、5週間目49%、6週間目62%、7週間目76%、8週間目

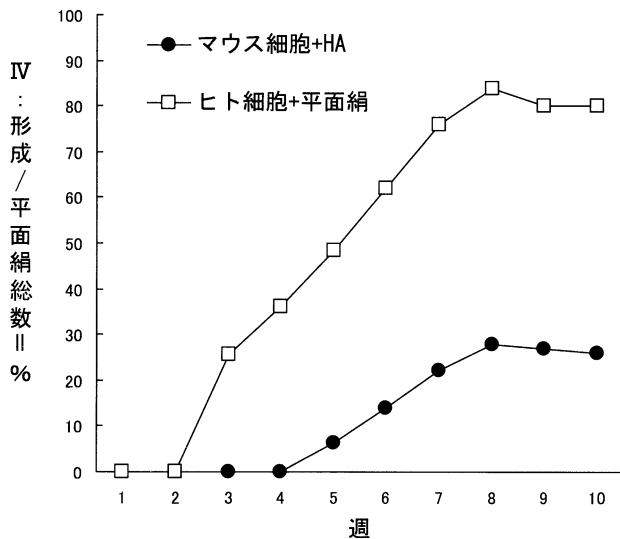


図4 温熱処理による三次元様増殖形成率の週ごと経時の変化

HA および平面絹の総数に対するIVの割合を示した。HA を用いてマウス細胞と混合培養した結果、IVはいずれも30%に至らなかった。一方、平面絹を用いて正常ヒト細胞と混合培養するとIVは80%を超え高い形成率となった。また、マウス細胞ではIVが5週目から形成されるものの、正常ヒト細胞ではそれより早い3週目から観察された。正常ヒト細胞（平面絹）の実験はマウス細胞（HA）の実験に比べ、細胞の熱ショック応答をより鮮明に示していた。

84%とピークを示し、その後9週間目は82%、10週間目で80%とやや減少した（図4）。IV：形成の割合は直線的に増加する傾向が観られ、その後若干の減少傾向が観られることは、マウス細胞（HA）の実験と同様であった。したがって、IVの形成率は8週前後を詳しくカウントする必要性が示された。

考 察

培養実験においては近年、フラスコ底面に二次元培養し単層増殖させるのではなく、素材と形状を工夫した担体（細胞の足場）に細胞を接着させ増殖により組織形成を誘導し、生体を反映した三次元培養の技術開発が進んでいる。この三次元培養技術は、再生医療にみられる生体モデルの作製（細胞の凝集による組織の再構築を目指す組織工学）の確立を目指している⁸⁾。一方、われわれは各種物理療法の効果を培養細胞とHAを用いて迅速に調べる方法を開発してきた²⁾。すなわち、マウス線維芽細胞を用い物理刺激を与えHAと混合培養すると、HAの周りを囲んだ細胞が立体的に組織形成した三次元様増殖が促進されることを見出

し、この三次元様増殖形成率をパラメータとして各種物理療法の最適条件に関する研究を行ってきた³⁻⁷⁾。

本研究は、低い細胞密度で増殖を停止するC3H10T $\frac{1}{2}$ マウス線維芽細胞を用いた三次元様増殖の実験を下に、さらに生体機能を解明するための基礎研究へと進めるため、初代培養の新生児包皮由来の皮膚線維芽細胞を用いた。これまでの研究でマウスC3H10T $\frac{1}{2}$ 細胞を用いてきたのは、この細胞が無限増殖能をもつものの、接触性増殖を停止し正常細胞のふるまいをすることに加え、長期間の培養で形態変化が少ないという特性のあることからであった⁹⁾。今回の実験で用いた初代培養細胞（正常二倍体）のヒト線維芽細胞では、完全に正常性を保っていることから、ヒトの生体内における細胞機能の解明に直接結びつく成果として期待される。あわせて生体親和性に優れ医療用補填材として実用化されているHAに加え、古くより手術用縫合糸として使用されている繭糸を平面状に加工した平面絹を用いてヒト線維芽細胞の担体とした。今回、われわれはヒト線維芽細胞と平面絹を用いた三次元様培養の評価系で温熱刺激による増殖形態の変化について調べ、基礎研究の成果を臨床応用へと発展させたい。本研究では、正常ヒト細胞と平面絹の実験結果と先のマウス細胞のHAの研究結果と比較し増殖形態の変化を検討した。その結果をもとに考察では、今後の展開を示すために温熱刺激の適用量とそのメカニズムを分子生物学的に検討した（図5）。

1. 温熱刺激の適用量の決定

適用量の検討については、これまでの研究結果から温熱刺激が三次元様増殖の形成に効果的に働きだす最小の温熱量（閾値）や細胞損傷（細胞死）を引き起こす温熱量（致死量）、また閾値と致死量の範囲で増殖活性が高まる温熱量（最適値）を明らかにすることができた。温熱条件は適用温度が40～45℃、処理時間は2～360分間として実験を行った結果、三次元様増殖形成のための最小の温熱量は43℃2分間、最適な温熱量は43℃10分間であった^{5,6)}。つまりマウス細胞の実験で適用温度は40～45℃、処理時間が2～360分間とした実験結果から、三次元様増殖形成に最適な温熱処理は43℃10分間であった。正常ヒト細胞と平面絹の実

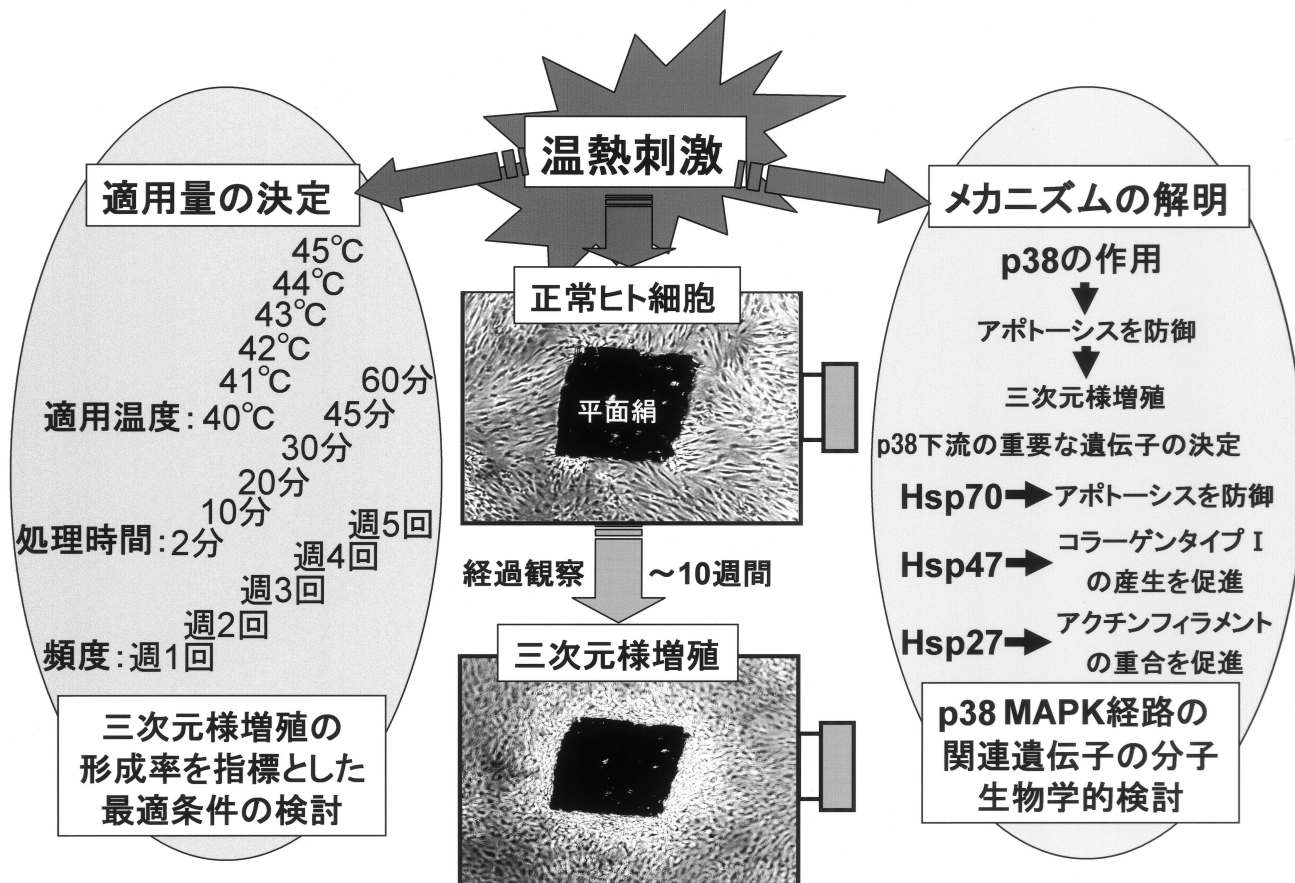


図5 温熱刺激による平面絹を担体とした正常ヒト細胞の三次元様増殖
—適用量とその分子生物学的検討—

験では、適用温度や処理時間だけでなく“頻度”（例えば週に1～5回の刺激）を含めた設定条件から適用量を決定したい。今後、最適な温熱処理を見つけ出し閾値や致死量をより明確に示す指標の確立をめざす予定である。

予備実験として40℃60分週1回と40℃180分週1回および40℃60分週4回の3つの条件で検討したところ、40℃180分週1回と40℃60分週4回の群はコントロールに比べ有意に高い形成率を示した。また40℃60分週1回はコントロールとほぼ同じ形成率であったことから、40℃60分週1回と40℃60分週4回の両群の比較は熱ショック蛋白の発現量の差によるものと考えられ興味深い結果となった^{5,6)}。また、三次元様増殖に4期の形成段階、つまり「きざし」「出来かけ」「ほぼ形成」「形成」を指標として温熱刺激の適用量をより明確にしていきたいと考えている。さらに、正常ヒト細胞の実験ではマウス細胞の実験に比べ早期に形成され、かつ高い形成率となった。これらの結果から温熱

刺激の適用量を設定温度と処理時間に加えて頻度についてもより明確にできた指標が活用できる。これからの実験では4つの指標を用いて温熱治療効果で重要な“頻度”を設定条件に加えたい。

2. 三次元様増殖のメカニズムの解明

いろいろな物理刺激は、p38 MAPKの経路を介して反応していることが明らかになっていることから¹⁰⁾、温熱刺激による三次元様増殖形成と温熱処理によるp38の働きについて関連性を調べる実験を行ってきた⁷⁾。ウェスタンブロット分析により、43℃で10分の温熱刺激により明らかなp38の活性化が認められた。p38のインヒビターを使った実験で、三次元様増殖の形成が抑制されることも確かめた。つまり、p38の活性阻害剤を加えると三次元様増殖が抑制されることを確認し、p38と三次元様増殖の直接的な因果関係を証明した。このことから、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を検証し

た。三次元様増殖形成にシグナル伝達経路の蛋白質の一つである p38が重要な働きをしていることを突き止め、適度な温熱刺激は p38を活性化することで三次元様増殖が形成されることを報告した。一方、熱ショックによる細胞死の実験結果から物理刺激が細胞に適度なダメージを与え、その損傷からの回復過程で担体への親和性を高め増殖形態を変化させ、ふつうでは起こらない重層したことを確かめた。最適な温熱刺激はアポトーシスを誘導し、残りの細胞が応答し三次元様増殖を形成したと推察され、この刺激量が三次元様増殖の形成機序の引金となっていると考えた。

正常ヒト細胞の実験では三次元様増殖形成に重要と考えられ、p38の下流に位置する熱ショック蛋白を中心に解析する¹⁰⁾。熱ショック蛋白はストレスに応答して発現が誘導され、様々な細胞機能に関わり恒常性維持を担っていることが知られている。近年、細胞外のいろいろなストレス刺激は p38 MAPK を経てアポトーシスが誘導される一方で、細胞増殖にも作用することが判っている^{11,12)}。しかし、p38 MAPK 経路の中で熱ショック蛋白が三次元様増殖にどのように関与しているかは不明である。われわれは、マウス細胞の実験結果から p38が熱ショックによるアポトーシスを防御するなどの重要な働きをしていることを突き止めた⁷⁾。最近、各種の熱ショック蛋白のうち Hsp70¹³⁾や Hsp47¹⁴⁾および Hsp27¹⁵⁾は、それぞれ固有の働きがあることが報告されていることから、三次元様増殖形成

において重要な蛋白質と考え分析したい (図 6)。

特に Hsp27は p38の下流にある転写因子であることや、熱ストレスに対する直接的な保護作用があると報告されている¹⁰⁾。さらに近年、温熱刺激に対する細胞内の一連の化学反応が明らかになるなかで、ミトコンドリアから流出されるアポトーシス誘導蛋白のチトクロム C と Hsp27が結合してアポトーシスを防御していることが報告されている¹⁵⁾。これまでに予備実験として温熱刺激によるヒト線維芽細胞の p38と Hsp27の活性化について調べたところ、p38は41と43℃で活性化が認められ、一方の Hsp27は39と41℃で強い発現が認められている。このことから三次元様増殖の形成率と Hsp27の発現量に関係があるものと推測している。また、三次元様増殖が形成されるためには、温熱刺激に反応して平面絹を足場にするため細胞移動が起こる。その際、駆動部位となるラメリポディア (葉状仮足) では細胞骨格のアクチンフィラメントでできた密な網目構造が知られており、その重合を Hsp27が促進させるとの報告があり細胞移動や細胞運動といった観点からも注目したい¹⁶⁾。われわれは、すでに N-末端融合蛍光タンパク質ベクター (Clontech 社製) に Hsp27遺伝子を組み込んだプラスミドを構築している。これを正常ヒト細胞に遺伝子導入し Hsp27タンパクの細胞内局在や三次元様増殖能に与える影響を検討する予定である。

Hsp70は分子シャペロンとしての蛋白修復作用があ

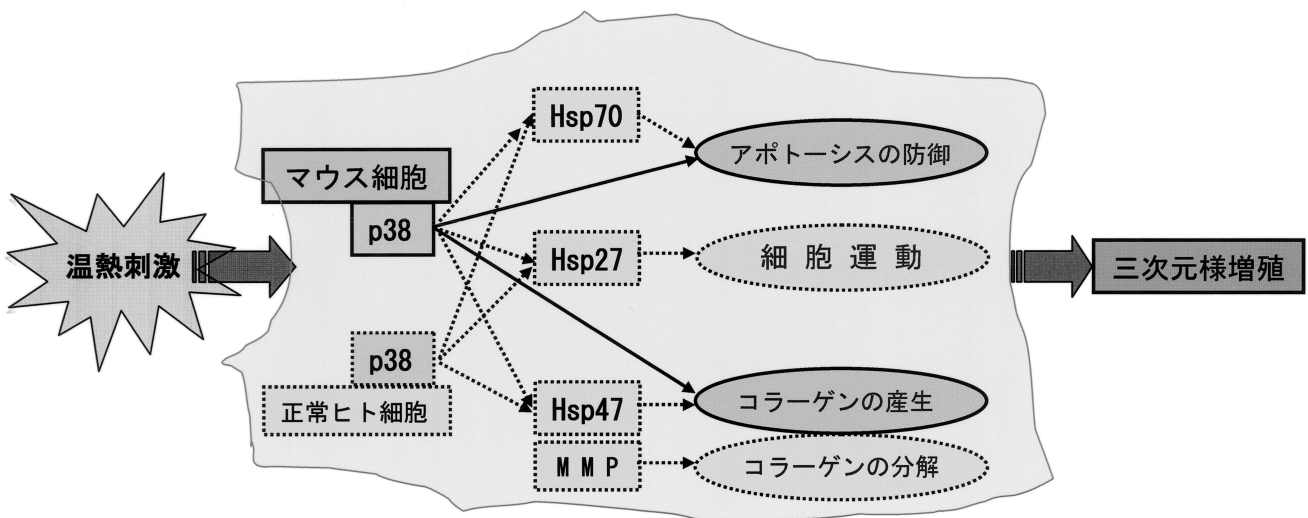


図 6 実線部分がマウス細胞の実験で確認してきたこと
点線部分がヒト細胞でこれからの実験で調べること

ることは古くから知られている。最近、がん治療の温熱療法（ハイパーサーミア）に関する研究¹⁷⁾などから、温熱刺激に対する細胞内シグナル伝達経路の解明が進み、温熱処理により細胞がアポトーシスに導かれる一方、同時に増殖に誘導されるしくみが判っている¹⁷⁾。特に熱ショックでミトコンドリアの機能が障害されチトクロム C の漏出を引き起こすことが報告されている。このチトクロム C は Apaf-1 とカスパーゼ 9 と複合体をつくり、下流のカスパーゼ 3 を活性化しアポトーシスが進行することが解っている。その経路のなかで、温熱刺激で誘導される Hsp70 がアポトーシスシグナル因子 Apaf-1 と結合し、アポトーシスの重要な開始イベントであるアポトソーム (apoptosome) の形成を阻害することが報告されている¹³⁾。

さらに、Hsp47 はコラーゲン特異的蛋白と言われ、コラーゲンを多量に産生している細胞では Hsp47 も大量に産生され、またコラーゲンを作っていない細胞では Hsp47 も全く作られていないとの報告がある¹⁴⁾。加えて、Hsp47 は小胞体に局在するストレス蛋白であり、分泌物はゴルジ体で細胞外に排出され、その際に異常なコラーゲンの分泌を抑えるなどの機能をもつことが解っている¹⁴⁾。温熱刺激は細胞膜を介し細胞内シグナル伝達され、転写因子により核に作用していく一方で、直接、細胞質内で早期に応答する機構をもっていることも想定できる。三次元様増殖形成の初期には、コラーゲンは必要不可欠な産物となるものの、あまりに多量に産生されると細胞移動が阻害されてしまう。そこで細胞運動が起りやすい状態を作り出し、コラーゲンの制約を解除する酵素が不可欠となる。三次元培養を用いた線維芽細胞の増殖には、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) によるコラーゲンの分解が必須であることが報告されている¹⁸⁾。したがって、細胞はコラーゲンの産生と分解の相反した制御機能をたくみに働かせて三次元様増殖の形成を成就させていると考えられる。このことから Hsp47 と MMP の共役性が三次元様増殖のメカニズムの重要なカギになるものと推察され MMP の活性を調べる予定である。

以上まとめると、生体組織は損傷を受けても殆ど自己修復するが、これは組織を形成している細胞がダメージから回復するという細胞機能に依存している。

最適な温熱刺激が与えられた細胞は、ダメージからの回復過程で三次元様増殖が形成されたものと考ええる。熱ショックは p38 MAPK 経路を介して反応しており¹⁰⁾。p38 MAPK の活性化は直ちに熱ショック蛋白の Hsp70 や Hsp27 および Hsp47 の様々な働きを誘導している。Hsp70 はアポトーシスの防御¹³⁾、Hsp27 は重層のための細胞運動¹⁵⁾、Hsp47 はコラーゲンの産生の促進¹⁴⁾ という主要な働きが報告されていることから、これらの発現が三次元様増殖形成に関与していると考ええる。つまり、p38 MAPK のシグナル伝達を介して、これらの熱ショック蛋白質群がたくみに連動して働き、アポトーシスを防御するとともに細胞外マトリックスが合成され、細胞の移動により重層した三次元様構造が作られたと推察している。

3. 結論

三次元様増殖の形成過程には “細胞の損傷と回復”、“細胞の生理的活性物質の産生” および “細胞の運動と移動” という現象が含まれ、これらには様々な細胞機能が関与していることが分かっている。本実験は、ストレスに耐えアポトーシスを防御し、ダメージから自己修復を図るという細胞のもつ本来の機能回復能力そのものを探ることになる。この実験系で正常ヒト細胞の三次元様増殖の適用量の決定とメカニズムの解明が進めば、物理療法や運動療法の効果に関する機能回復促進につながる画期的な知見が得られるものと期待される。細胞を三次元様増殖に導く特定の遺伝子が同定できれば、生体における骨折治療や創傷治癒および褥瘡治療などに有効なエビデンスが期待できるものと考えている。最近では多くの医療分野で遺伝子治療が研究され臨床応用がなされている中、本研究はリハ効果の判定を細胞レベルのみならず、遺伝子レベル・分子レベルで決定できる可能性を秘めていると考えている。

謝 辞

本研究は平成18年度学内共同研究費ならびに18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

We have reported the optimal conditions in which physical stimulus is effective for enhancing three-dimensional (3D)-like proliferation of mouse fibroblasts mediated by hydroxyapatite. In this study, we investigated the changes in proliferation pattern of normal human cells induced by heat treatment using pressed silk. Since the results of our previous experiments using mouse cells showed that the optimal conditions for heat treatment were 43 °C for 10 minutes, we used the same conditions in this study. It was found that the 3D-like proliferation of cells changed in stages from “signs of 3D-like pattern formation”, “beginning of 3D-like pattern formation”, “almost complete formation” and finally “complete formation”. Moreover, human cell 3D-like proliferation pattern was formed more rapidly and at a higher rate than that in experiments using mouse cells. The finding of formation of a 3D-like proliferation pattern by normal human cells may be of clinical significance for *in vivo* cell function in humans. Moreover, the finding in this study of four stages in the process of a 3D-like proliferation pattern should be useful for determination of the most effective dose of heat treatment. In this paper, we compare the changes in proliferation pattern of normal human cells induced by pressed silk with the results of our previous study using mouse cells, and we discuss the mechanisms underlying the 3D-like proliferation pattern of cells at the molecular and cellular levels. We also discuss the potentially important roles of Hsp70, Hsp47 and Hsp27 as well as p38 in the response of cells to heat treatment.

文 献

- 1) 池田 聡 田中信行 (2001) 分子生物学のリハビリテーション医学への応用. J Clin Rehab 10 : 334-337
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) Takezawa T, Ozaki K, Takabayashi C (2007) Reconstruction of a hard connective tissue utilizing a pressed silk sheet and type-I collagen as the scaffold of fibroblasts. Tissue Eng (*in press*)
- 9) Reznikoff CA, Brankow DW, 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
- 10) Ono K, Han J (2000) The p38 signal transduction pathway activation and function. Cell Signal 12 : 1-13
- 11) Eliopoulos AG, Gallagher NJ, Blake SMS 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
- 12) 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
 - 13) Beere HM, Wolf BB, Cain K et al (2000) Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2 : 469–475
 - 14) Nagai N, Hosokawa M, Itohara S et al (2000) Embryonic lethality of molecular chaperone Hsp 47 knockout mice is associated with defects in collagen biosynthesis. *J Cell Biol* 150 : 1499–1505
 - 15) Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P et al (2000) Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2 : 645–652
 - 16) Lavoie JN, Hickey E, Weber LA et al (1993) Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J Biol Chem* 268 : 24210–24214
 - 17) Ohnishi K, Yuki K, Ohnishi T et al (2004) Hyperthermic cancer therapy combined with inhibitors targeted against heat-induced signaling factors. *Jpn J Hyperthermic Oncol* 20 : 143–159
 - 18) Hotary KB, Allen ED, Brooks PC et al (2003) Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix. *Cell* 114 : 33–45