

複合性局所疼痛症候群 1 (CRPS1)モデルに対するクライオセラピーの効果

-オミックス解析を用いた検証-

菅澤威仁

筑波大学医学医療系 臨床検査/スポーツ医学研究室 研究員

1. はじめに

複合性局所疼痛症候群 1(CRPS1)は捻挫、骨折、打撲などの外傷に引き続いて起こり、慢性的な痛みや関節拘縮、組織の萎縮を伴う疾患で、罹患した場合、長期にわたり多大な苦痛を強いられる。スポーツ選手が本疾患を患った場合は長期の療養を強いられ、選手生命に大きな悪影響を及ぼす事となる。現在まで本疾患に対する確立された診断方法や予防・治療法は開発されておらず、本邦の期間を挙げて治療法や診断法の研究・開発が進められている。CRPS1 の病態形成の大きな要因の一つとして、組織損傷に引き続く過剰な活性酸素種 (ROS) の発生が挙げられている。CRPS1 の病態形成時には、生体が防御しきれない程の過剰な ROS が発生しミトコンドリアや正常組織を障害すると共に、さらなる炎症および ROS の発生を助長し、負のサイクルに陥る事で病態の慢性化を引き起こすとされている (Taha R and Blaise GA, 2012)。実際に CRPS1 を発症した患者の血中や唾液中の酸化ストレスを反映するバイオマーカーが上昇しており (Eisenberg E et al., 2008)、さらに CRPS1 が原因となり切断された肢の筋中では過剰な ROS とミトコンドリア障害が認められたと報告されている (Tan EC et al., 2011)。これらより、CRPS1 の病態発生時に過剰な ROS を消去すると共にミトコンドリアを ROS から守る事は重要であると言える。

我々の研究グループでは、外傷局部に対して使われるクライオセラピーの効果と、運動器の損傷治癒に関わる様々な細胞を用いた実験系にて検証してきた。その結果、冷却刺激はミトコンドリア活性や抗酸化系酵素の活性を上昇させるが、冷却温度が異なるとその効果は異なり、さらに本応答を引き出すための至適温度が存在する事を世界で初めて見出した (Sugasawa et al., 2016)。さらに、至適温度と思われる 4°Cにて筋組織に冷却刺激を与えた結果、抗酸化酵素やミトコンドリア新生・活性化に関わる多くの遺伝子の発現が上昇する事を見出しており、これまでの研究成果および CRPS1 の病態を加味して考察すると、クライオセラピーは CRPS1 に対し、予防・治療的な効果をもたらすことが十分に考えられる。よって、本研究では CRPS1 のモデル動物を用い、クライオセラピーが CRPS1 にもたらす効果を分子レベルで網羅的に解析し、明らかにする事を目的とした。しかしながら、先行研究を基にし (Coderre TJ et al., 2004; Lee SH et al., 2017)、マウス足部に対し CRPS1 のモデル構築を数回試みたが、十分な病態の表現型が得られず (疼痛閾値の低下、過度の腫脹・発赤など)、モデル構築に至らなかった。そこで、今回の研究で予定していたコントロール群のマウスを用い、筋におけるクライオセラピーの分子メカニズムを解析することから研究を開始した。これまでの我々の研究から、クライオセラピーが転写因子である CREB (cAMP response element binding protein) の活性化を誘導する可能性が強く示唆されているため、先ず本分子に着目し解析を行った。

2. 研究方法

2.1 In vitro 実験

2.1.1 細胞への冷却刺激

Cell line として、マウス筋胞芽細胞 (C2C12 cell)、マウス線維芽細胞 (3T3L1 cell) を使用した。各細胞を、10%血清を含む DMEM 培地で複数回、継代培養後、 2×10^5 / well となるように 6well plate に播種した。その 24 時間後、4°C に調整した冷水に浮かべる事で冷却刺激を 15 分間 1~3 セット (セット間のインターバルは 15 分間、37°C でインキュベート) 負荷し、各時間で細胞を回収し、ウエスタンブロッティング (WB) にて CREB のリン酸化すなわち活性化を評価した。

2.1.2 CRE レポーターアッセイ

ヒト胎児腎細胞 293 (HEK293) 細胞を、10%血清を含む DMEM 培地で複数回、継代培養後 24 well plate に 0.25×10^5 / well となるように播種し、その 24 時間後、CRE (cAMP response element) レポータープラスミドをトランスフェクションし、さらにその 24 時間後、前述と同様の方法で冷却刺激を行い、細胞を回収後、CREB の転写活性を評価した。

2.1.3 CREB-CBP 複合体形成の解析

CBP (CREB-binding protein) はヒストンアセチルトランスフェラーゼであり、CREB の転写活性化に必須の因子であるとされているため本実験を行った。ヒト胎児腎細胞 293 (HEK293) 細胞を、10%血清を含む DMEM 培地で複数回、継代培養後 2×10^5 / well となるように細胞を播種した。その 24 時間後 HA タグ付きの CBP 発現プラスミドをトランスフェクションし、そのさらに 24 時間後、前述と同様の方法で冷却刺激を行い、細胞を回収後、CREB-CBP の複合体形成を免疫沈降法 (IP) および WB にて評価した。なおポジティブコントロールとして 50 μ M Forskolin (FSK) を用いた。

2.2 Ex vivo 実験

4 週齢の CBA マウス (オス) の前脛骨筋をサンプリングチューブ内に採取し、10mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4)、10%血清を含む DMEM 培地中に浸漬した。37°C・20 分間のプレインキュベート後、冷水を用い、4°C・15 分間の冷却刺激を 1~3 セット行い (セット間のインターバルは 15 分間、37°C でインキュベート)、最後の冷却刺激から 1 時間後に各筋組織を回収した。なおコントロールの筋は 37°C でインキュベートした。各筋から RNA を抽出し逆転写後、CREB のターゲットとなる遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で評価した。さらに同様の実験系を用い、冷却刺激が筋内の CREB のリン酸化、すなわち活性化に対する影響も評価した。

2.3 In vivo 実験

10-11 週齢の ICR マウスに対し、吸入全身麻酔が可能な補定器に挿入後、イソフルランによる吸入全身麻酔を施しながら、右下肢 (膝上まで) に対し、4°C の冷水へ 15 分間・3 セット浸漬させた (セット間のインターバルは 15 分間、通常の飼育ケージに戻す)。なおコントロールのマウスは冷水無しの容器に下肢を露出させた。本冷却刺激を 9 日間継続もしくは 1 日のみ行う実験群を

設定し、最後の冷却刺激から 12 時間後に各筋を回収し、ミトコンドリア DNA 数およびミトコンドリア新生、抗酸化能に関わる遺伝子や、CREB- Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1- α) の下流にあたる遺伝子の発現をリアルタイム PCR で評価した。

2.4 研究倫理

本動物実験は、実験計画書を筑波大学動物実験委員会へ提出し、承認を得て実施した (承認番号: 18-071)。

3. 結果と考察

3.1 細胞に対する冷却刺激はセット数に依存して CREB のリン酸化の亢進させる

冷却刺激により、CREB のリン酸化が C2C12 cell および 3T3L1 cell で大幅に亢進したが、冷却のセット数に依存してリン酸化の度合いが変化した。特に 2 セット目では顕著な亢進がみられたため、CREB のリン酸化を引き起こすためには冷却のセット数が重要な意味を持つ事が十分に考えられる (Fig. 1)。

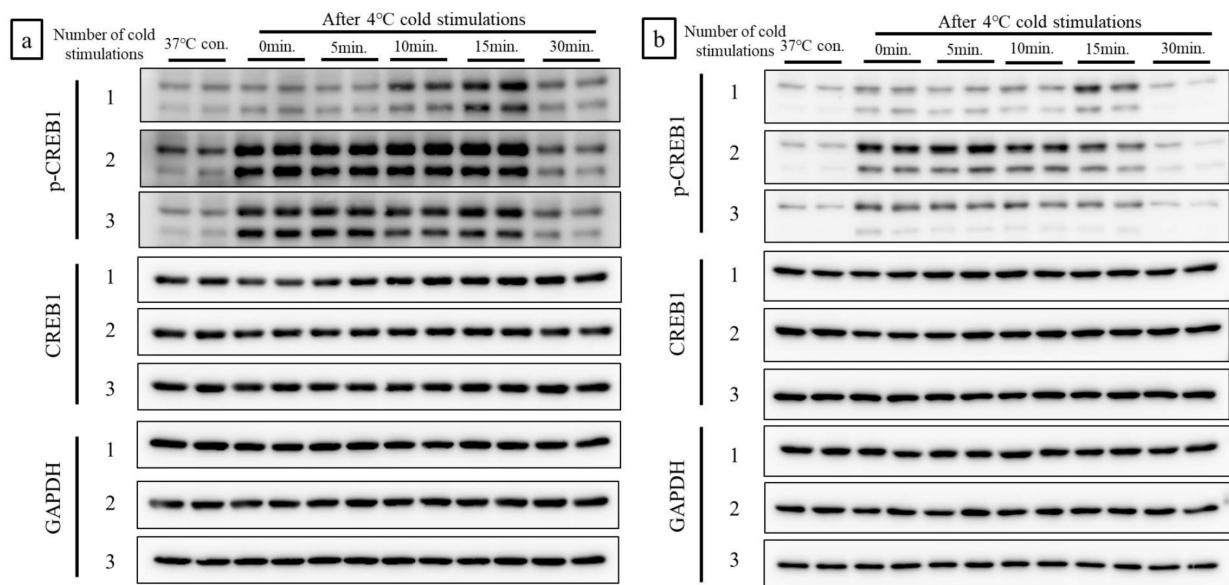


Fig. 1 各セット数の冷却刺激が CREB のリン酸化に与える影響

a: C2C12 cells; b: 3T3-L1 cells. Con.: control (no cold stimulation).

3.2 細胞に対する冷却刺激はセット数に依存して CREB 転写活性を亢進させる。

冷却刺激による CREB の転写活性の変化を評価したところ、冷却のセット数に依存して転写活性が増大した。1 セットの冷却刺激では転写活性の亢進は見られなかったものの、2-3 セットでは有意に亢進した。本事象からも冷却のセット数が重要な意味を持つ事が十分に考えられる (Fig. 2)。

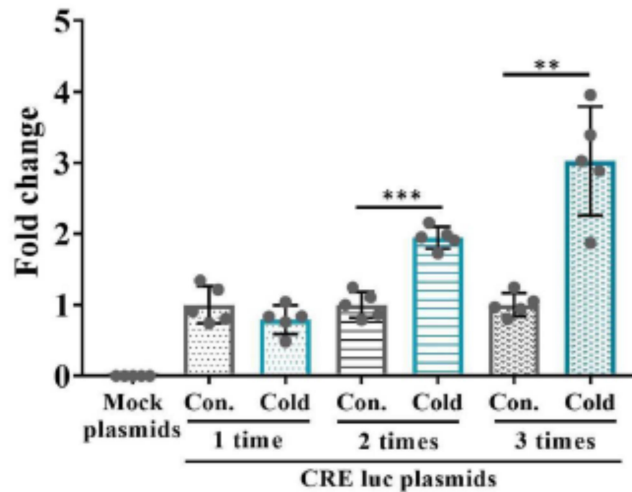


Fig. 2 各セット数の冷却刺激が CREB の転写活性に及ぼす影響

Mock plasmids were used as negative controls with values ~0. Con: control (no cold stimulation); Cold: 286 15-min cold stimulations. N = 5 per group. ** P < 0.01, ***P < 0.001 according to Welch's t-test.

3.3 細胞に対する冷却刺激は CREB-CBP 複合体の形成を増加させる

CREB-CBP の複合体はコントロールでも形成されたが、冷却刺激により強まることが確認された。CREB がリン酸化されると CBP をリクルートし転写を促進する事が先行研究で明らかにされており、本事象が CREB の転写活性を増加させた大きな要因であると推察できる。

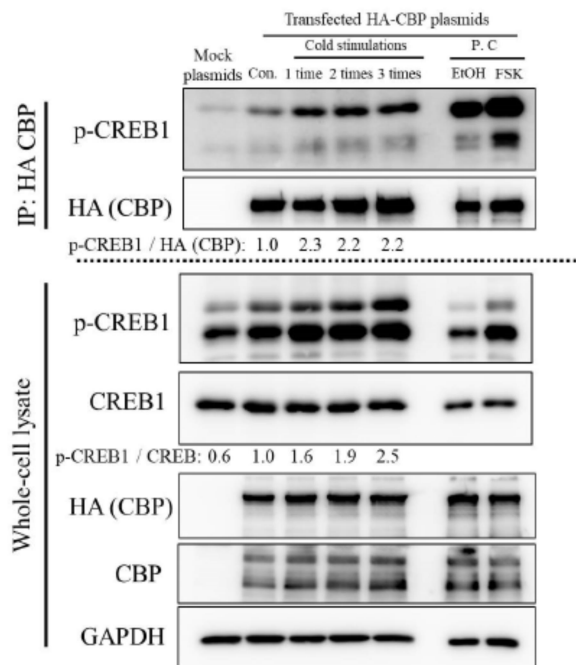


Fig. 3 各セット数の冷却刺激が CREB-CBP 複合体形成に及ぼす影響

P.C lane: positive control as check 277 with forskolin (FSK) or ethanol (EtOH) for increases in interactions between CBP and p-CREB. Mock 278 plasmids were used as negative controls. Con.: control (no cold stimulation).

3.4 筋組織に対する冷却刺激はセット数に依存して CREB の標的遺伝子の発現を亢進する。

Ex vivo 実験系にてマウスの前脛骨筋に冷却刺激を与えたところ、2-3 セットの冷却刺激で複数の CREB 標的遺伝子の発現が亢進した。本結果は細胞で検証した CREB のリン酸化の亢進、転写活性の亢進、CREB-CBP 複合体の形成の結果を支持している。さらに、細胞の実験系と同様に、冷却刺激によって筋組織内の CREB のリン酸化も亢進したが、セット間の違いは認められなかった。培養された細胞と実際に生体に存在する筋組織は外部環境が異なるため、このような違いにより異なる結果が生じたと推察できるが、CREB のリン酸化すなわち活性化を引き起こすことは間違いないと考えられる (Fig. 4, 5)。

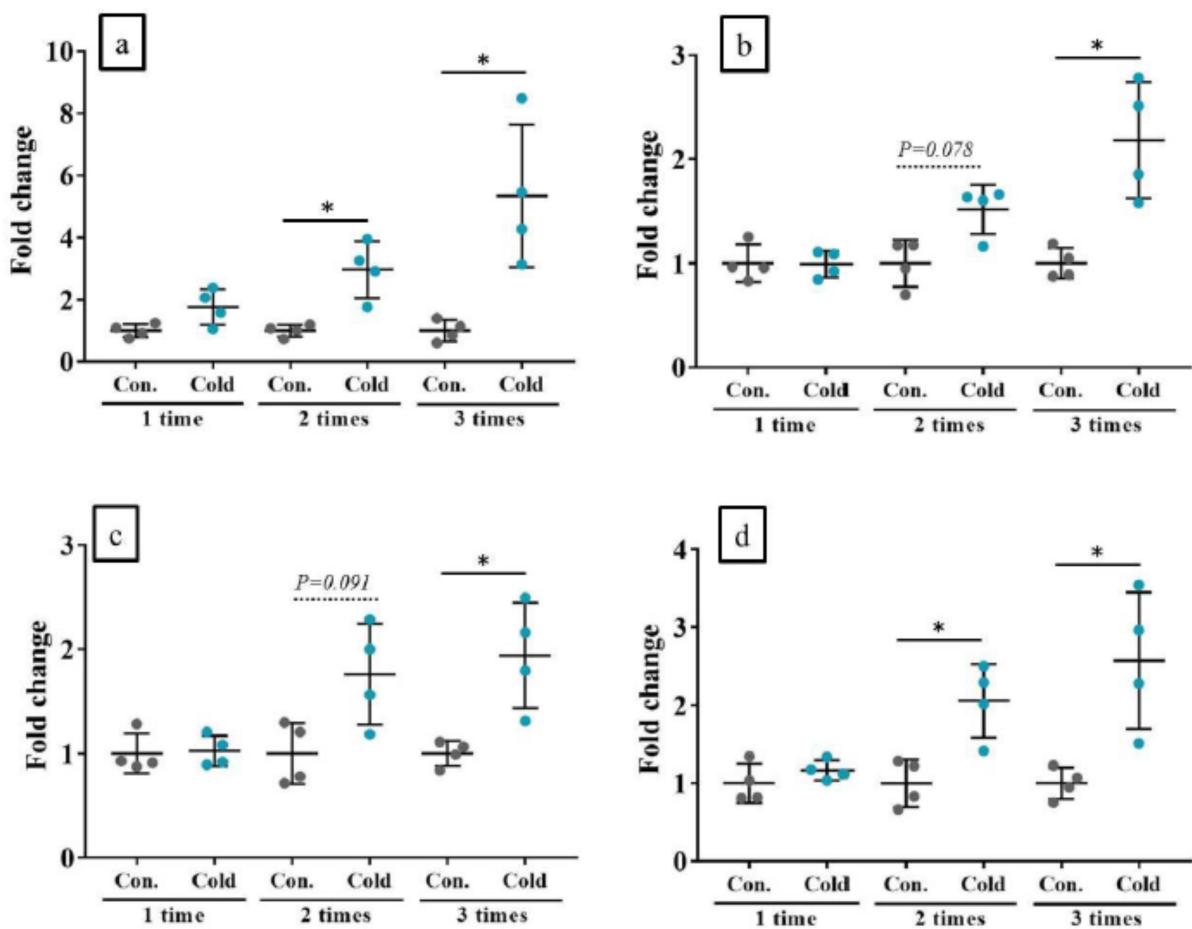


Fig. 4 1~3 セットの筋組織への冷却刺激が CREB 標的遺伝子の発現に及ぼす影響
a: Pgc-1α; b: Creb1; c: Glut4; d: Cpt1b. Con: control (no cold stimulation); Cold: 15-min cold stimulation.
N = 4 per group. * P < 0.05 according to a paired t-test.

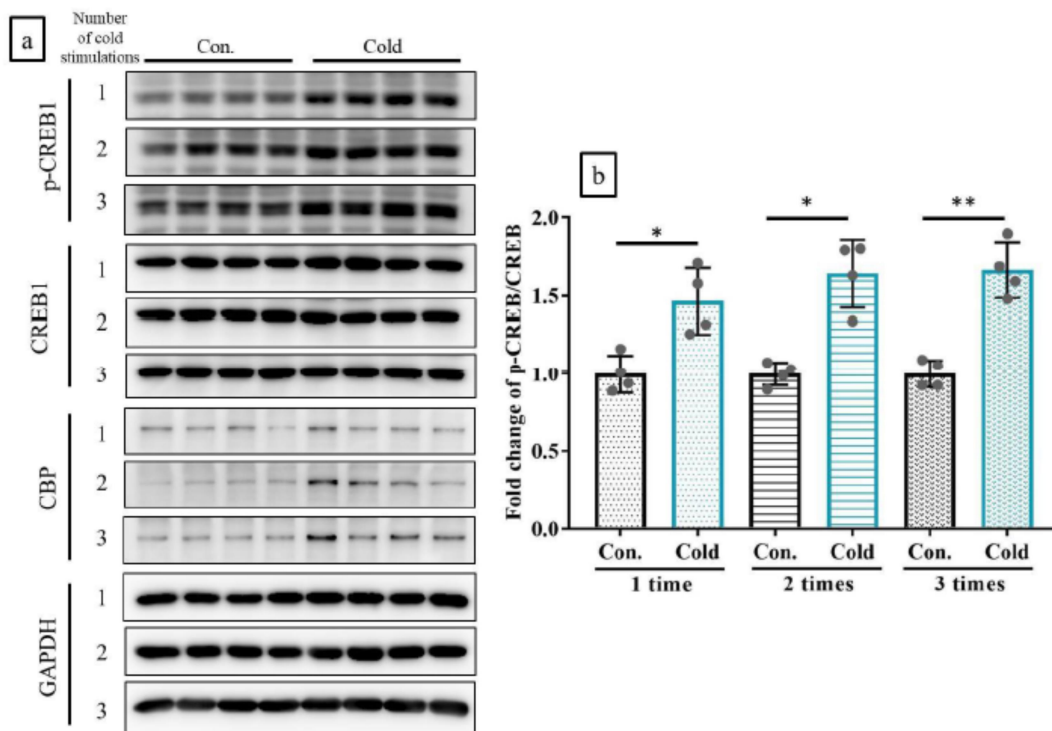


Fig. 5 1~3 セットの筋組織への冷却刺激が CREB のリン酸化に及ぼす影響

a: WB analysis of p- 297 CREB1 and other factors; b: Quantification of band intensities of p-CREB1/CREB1. Con: control (no cold stimulation); Cold: 15-min cold stimulations. N = 4 per group.

* P < 0.05, **P < 0.01 according to a paired t-test.

3.5 継続的なマウス下肢への冷却刺激はミトコンドリア新生や関連遺伝子の発現を増加させる

9 日間におよぶマウスの下肢への冷却刺激は、筋組織内のミトコンドリア DNA 数を増加させるとともに、ミトコンドリア新生や抗酸化能に関わる多くの遺伝子の発現を増加させた。しかしながら 1 日のみの冷却刺激ではほとんど影響を及ぼさなかった (Fig. 6. 7)。本結果から、局所に対するクライオセラピーの効果を引き出すためには、継続的に数日間の施行が重要な意味を持つと推察できる。

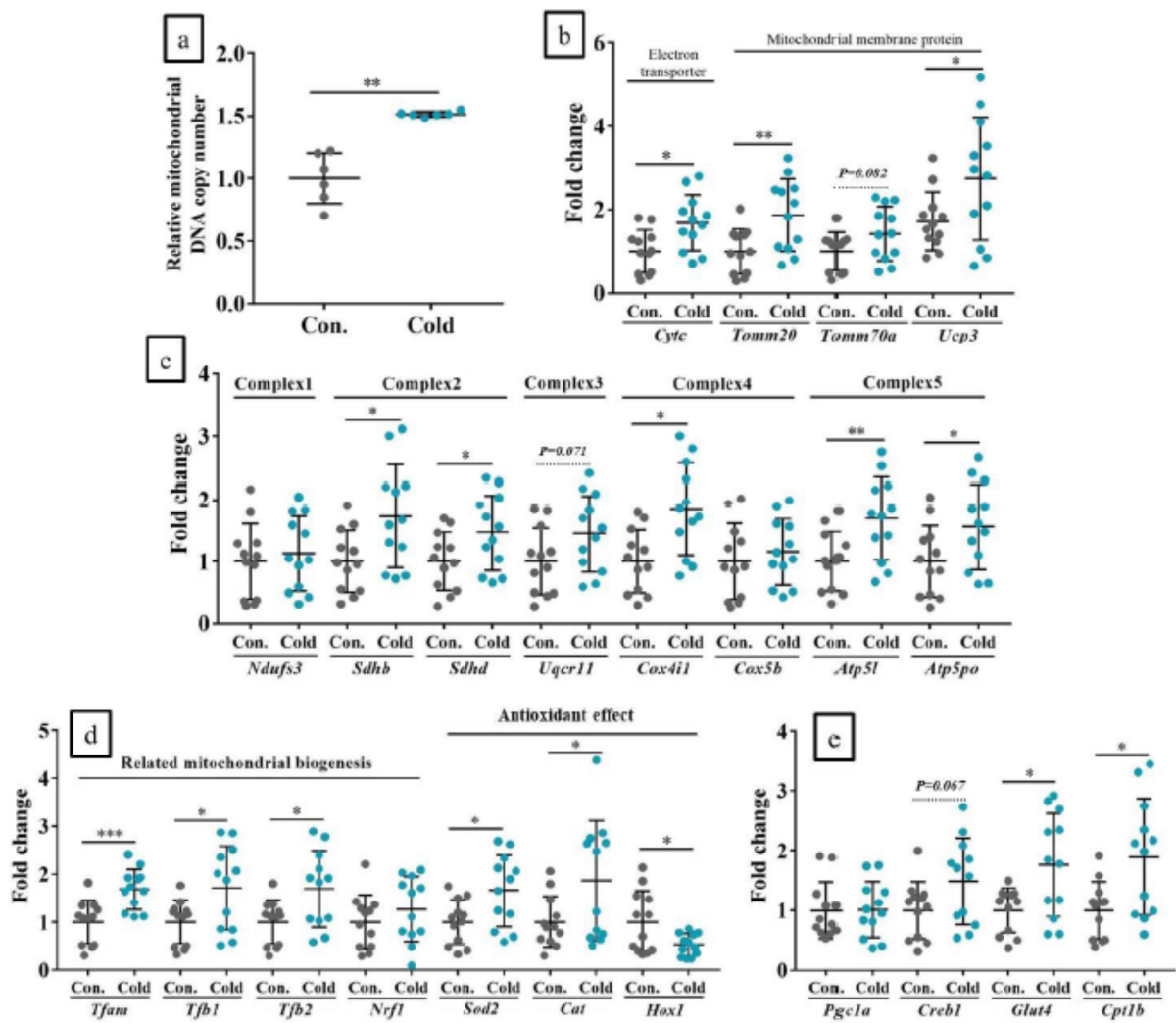


Fig. 6 9日間のマウス下肢への冷却刺激がミトコンドリア新生、各遺伝子発現に及ぼす影響

a: Mitochondrial DNA copy number; b: mitochondrial component genes; c: mitochondrial complex genes; d: Pgc1- α regulated genes; e: CREB-targeting genes in response to chronic in vivo cold stimulation. Con: control (no cold stimulation); Cold: 15-min cold stimulations. N = 12 per group. * P < 0.05, **P < 0.01 according to Welch's t-test.

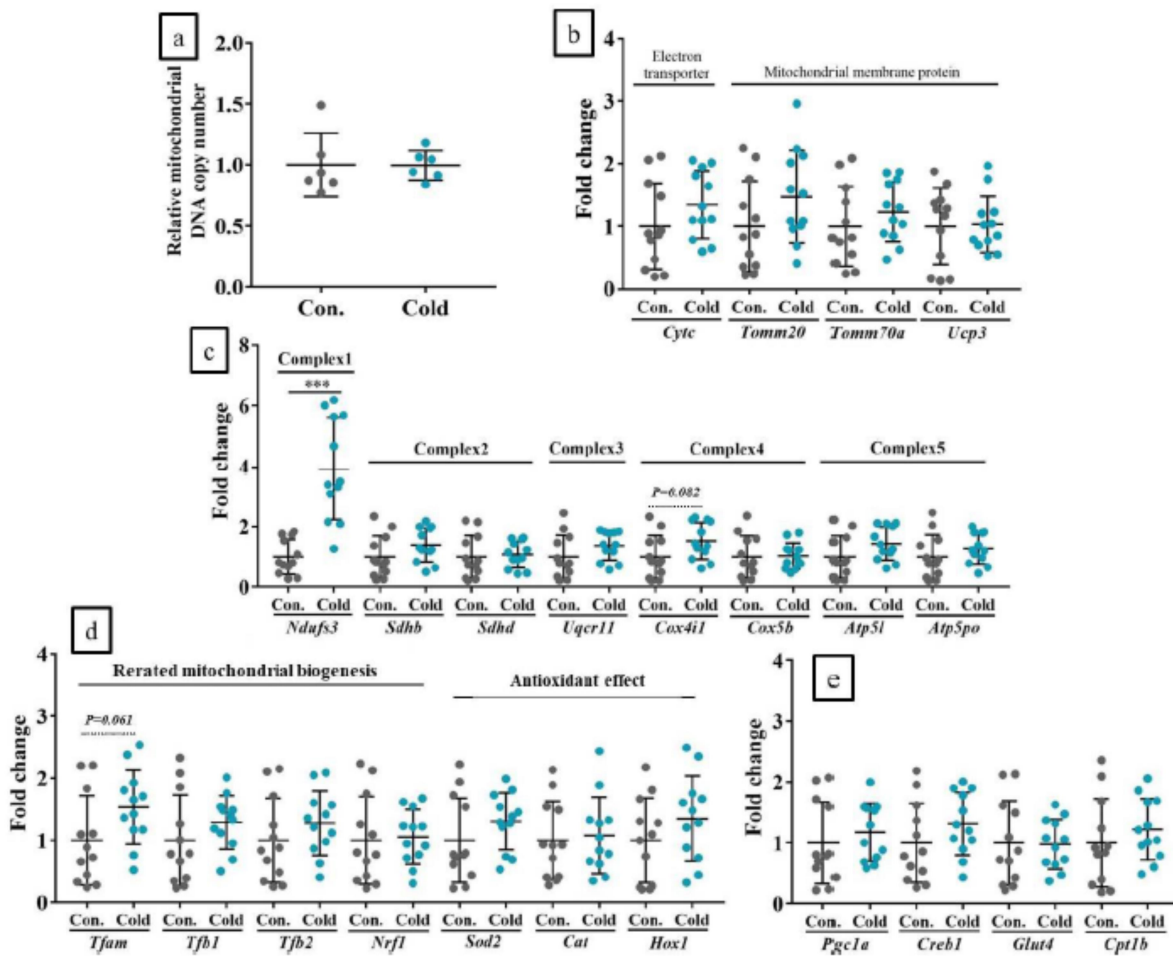


Fig. 7 1日目のみのマウス下肢への冷却刺激がミトコンドリア新生、各遺伝子発現に及ぼす影響
a: Mitochondrial DNA copy number; b: mitochondrial components genes, c: mitochondrial complex genes, d: Pgc1- α regulated genes; e: CREB targeting genes in acute cold stimulation in vivo. Con: control (no cold stimulation); Cold: 15-min cold stimulation. N = 12 per group. ***P < 0.001 according to Welch's t test.

4. まとめ

本研究では、in vitro, ex vivo, in vivo の3つの実験系において、多角的側面からクライオセラピーの効果を分子レベルで解析した。その結果、冷却刺激は筋組織において CREB の活性化とそれに引き続く遺伝子発現やミトコンドリア新生を亢進させることが見出され、セット回数や継続期間が効果を引き出すための重要な因子であることが強く示唆された (Fig. 8)。さらに抗酸化系の遺伝子発現も増加させることから酸化ストレス耐性を亢進させる事も考えられた。当初、本研究では CRPS1 のモデル動物を用いクライオセラピーの効果を検証する予定であったが、モデル構築に至らなかった。しかし本研究結果から、クライオセラピーが CRPS1 に効果をもたらすことが十分に考えられ、今後は再度モデル構築に努め、クライオセラピーの CRPS1 に対する効果を

分子レベルで検証していきたいと考える。本研究成果は国際誌へ投稿中であり、オープンアクセスが可能な Preprint として現在公表されている (Preprints 2019, 2019040277 [doi: 10.20944/preprints201904.0277.v1])。

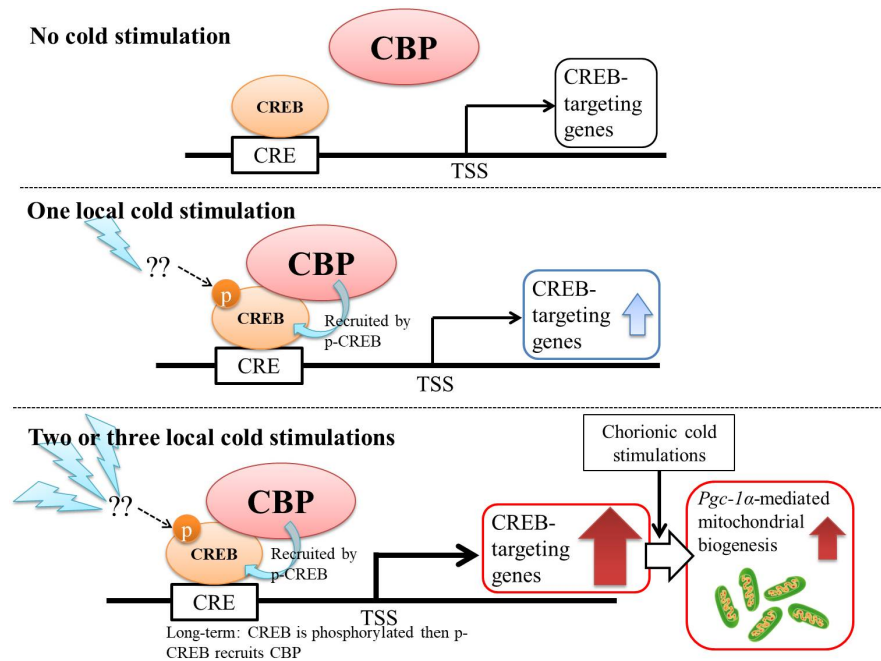


Fig. 8 本研究で示唆されたクライオセラピーの分子メカニズムの概要

5. 謝辞

本研究の遂行にあたり、研究助成金を交付いただいたミズノスポーツ振興財団に深く感謝申し上げます。