

2014/2013A

厚生労働科学研究費補助金

循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業  
(循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策実用化研究事業)

温泉利用が健康づくりにもたらす総合的効果についてのエビデンスに関する研究

平成26年度 総括研究報告書

研究代表者 前田 豊樹

平成 27 (2015) 年 5 月

## 目 次

I. 総合研究報告	
温泉利用が健康づくりにもたらす総合的効果についてのエビデンスに関する研究	1
前田豊樹	
(資料) 別府市高齢者「温泉と健康」のアンケート調査票な	
(資料) 調査結果集計表・グラフ	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	14
III. 研究成果の刊行物・別刷	16

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業）  
総括研究報告書

温泉利用が健康づくりにもたらす総合的効果についてのエビデンスに関する研究

研究代表者 前田 豊樹 九州大学病院別府病院内科准教授

研究要旨

温泉地別府市の65歳以上の高齢者対象の疫学的調査、臨床例における温泉治療効果検証、動物温浴実験による生体への効果の確認、細胞レベルを含む基礎的実験で温熱による抗老化効果検証と、多面的に温泉療法の医学的効果を検討した。最終年度となる今年度は、疫学的調査と臨床研究が終了となり、前年度までの動物実験、細胞培養実験の結果を含め、本研究のまとめの年度となる。疫学調査では、これまで主として生涯既往解析を行ってきたが、最近1年の既往の解析結果から、これまでの温泉効果の見直しを行った。その結果、温泉入浴が、高血圧、高脂血症、うつ病、気管支喘息、慢性肝炎の発症を抑制する可能性が示唆された。臨床的検討では、登録患者数を増やして鉱泥浴による線維筋痛症患者の疼痛軽減効果と抗炎症作用を確認した。また、寝たきり患者を温泉タンクよくさせることにより難治性の仙骨部の褥瘡を治癒しえた他、足湯による慢性腰痛の治療効果を報告した。さらに、人工炭酸泉浴の糖尿病患者の末梢血管拡張効果を確認した。これらの結果は、前年度までの結果と合わせて、温泉の利用は、その抗老化効果から健康増進、疾病予防と、治療効果として創傷治癒促進、慢性難治性疼痛緩和効果をもたらすもので、現代医療において、簡便で、高齢者にも安全に使える補助療法の一つとして、もっと汎用されるべきものであると考えられる。

A. 研究目的

別府市は温泉地として古くから有名である。温泉湧出量は世界第2位、また一地域に存在する温泉源泉数としては世界一を誇る。さらに全11泉質のうち10泉質が温泉として利用されている。申請者が所属する九州大学病院別府病院は、別府市にあり、温泉に関する疫学調査を行うのに最適な条件にある。わが国は、現在超高齢化社会を抱えているが、国民総人口は減少に転じ、少子高齢化により、ますます、高齢者医療の社会的重要性は重くなる一方である。移植医療、再生医療など医学の発展に伴う医

療費増大と相まって、日本経済において高齢者医療見直しは常に必要である。このような中、古来より湯治として親しまれて来た温泉治療を温熱治療の一つとして、また非侵襲的で経済的な補助治療の一つとして再評価することは大いに意味のあることであろう。温熱の生体に対する効果については未知の部分も多いが、ストレス緩和、結構増進、創傷治癒促進などから、様々な疾患以降かがあるとされているのは周知のことである。一方、その医学的効果は、様々な角度から検証されているが、規模の小さいものが多く、また古い研究も多い。そし

て、現代人の体質、生活様式、罹患疾患などの時代的変遷から、必ずしも現代医療とすぐ融合できない面も想定される。本研究は、この問題に答えるべく、大規模疫学調査、臨床研究、動物実験、細胞実験など、多方面で現代の研究手法により温泉の医用効果を探索して温泉の医用効果を検証し、わが国の医療の現状と将来における温泉医療のあり方を考える上での基礎データを提供することを目的としている。

## B. 研究方法

本申請に関しては、昨年度までに、動物実験、細胞培養実験は終了し報告している。最終年度となる、今年度は、疫学研究と臨床研究をまとめる形で進めた。

疫学研究：最終年度は、温泉入浴頻度、温泉浸漬時間、温泉利用期間、温泉利用時間帯、利用泉質と生活習慣病をふくむ14疾患と異なる種類の17種の悪性腫瘍性疾患の最近1年間の既往の有無について解析し、これらを逐一生涯既往の結果と照合して、特定の温泉入浴パターンが疾患の発症に影響するのか、ある種の疾患の既往により温泉入浴のパターンが限られてしまうのかを区別して、本当に温泉の入浴法が失火発症に影響しているかどうかの確認を行った。さらに、温泉入浴パターンが、年齢により異なる面があったため、男女とも、年齢が入浴パターンに影響されない再グループ化した条件の下で、温泉効果が再確認されるか最終検証を行った。これを、生涯既往疾患と最近1年の既往疾患の両方で行い、

疾患既往と温泉利用の関連が、双方で確認できた場合に温泉利用がその疾患の予防効果につながると判定した。

臨床研究：前年度までに、慢性心不全に対する温泉治療効果を報告したが、最終年度は、平均4週間の入院鉱泥浴治療による16名の線維筋痛症患者の疼痛緩和効果の検証、4週間連日の炭酸入浴剤利用による8人の外来糖尿病患者におけるヒト血管内皮機能の変化の追跡を行った。

### (倫理面への配慮)

アンケート調査ならびに人工炭酸入浴の効果の研究は、九州大学医系地区部局臨床研究倫理審査委員会により承認されている。個人の特性を防いでいる。ラット温浴実験は、九州大学動物実験委員会に届け出て承認を得ている。温泉治療適用者におけるテロメア解析は、九州大学大学院医学研究院ヒトゲノム・遺伝子解析倫理委員会より承認されている。血液検体採取では文書同意を得た上、連結匿名化により個人情報を保護している。

## C. 研究結果

平成25年度には、温泉の連日利用者と非連日利用者間で温泉利用期間10年未満と40年以上別の疾患既往の有意差を求めた(表1)。それに加え、疾患未既往群と各疾患既往者とを温泉利用状況ごとに対比させて、利用条件ごとの利用率の有意差を検討した。すなわち、浸漬時間、温泉利用時間帯、利用泉質別に各疾患既往との関連を

検討した(表2-表7)。さらに、温泉の利用状況とその既往率が関連すると見られるいくつかの疾患について、利用泉質に関して検討を加えた。利用泉質は利用数から解析可能なものは、単純泉、塩化物泉、炭酸水素塩泉の3つに絞られた。次に、質問項目に挙げた最近1年の既往疾患に関する回答について、生涯既往で行ったのと同様に温泉利用との関連を調べ、1年既往と生涯既往で、同傾向かどうかで、温泉利用効果か、疾患罹患による見かけ上の温泉利用の変化かを区別した(表8, 9)。その結果、高血圧、高脂血症、うつ病、慢性肝炎、気管支喘息が候補として残った(表10)。

糖尿病患者における炭酸入浴：同年齢層の24名の糖尿病患者を対象に、炭酸入浴剤入りの湯(〜200ppm炭酸ガス)に連日4週間入浴(16名)した際の、血管内皮機能への影響を、水道水の沸かし湯浴の8患者と比較して検討した。その結果、脈波伝導速度の低下とHbA1c8.0%以下の患者での血管拡張が観察された。(表11, 図1)

線維筋痛症患者への鉱泥浴の鎮痛効果：慢性疼痛性疾患である線維筋痛症患者16名に対する4週間の40℃10分平日連日鉱泥浴入浴前後で比較すると、疼痛、うつ状態スケールの改善と、CRPの有意な低下を認めた(図2)。

#### D. 考察

アンケート調査結果：本年度は、温泉利用法と最近1年間の既往との関連を割り出し、生涯分と最近1年分で同じ傾向を示す

ものを、温泉利用の結果既往率に差が生じたものと考えた。初期解析の候補疾患のうち、虚血性心疾患と脳卒中は、温泉利用について過去1年以内の発症と生涯発症との比較で、全く変わらないか、あるいは逆の傾向が現れたため、疾患発症により、温泉の利用頻度が減少したのと考え、候補から外した。しかし、高血圧は、他の多くの動脈硬化性疾患の素地となるため、温泉入浴による高血圧発症抑制は、二次的に動脈硬化性疾患の発症抑制につながる可能性がある。本解析では、発症の結果温泉利用しなくなった集団の存在で、その傾向が検出できなかった可能性がある。高血圧のほか、高脂血症に対する温泉の効果が伺え、虚血性心疾患、脳卒中、腎臓病などの動脈硬化性疾患についても、温泉利用による発症抑制効果が潜在的に存在すると予想される。泉質については、最終候補6疾患についての検討で、炭酸水素塩泉浴と塩化物泉浴に有用性が認められた。炭酸水素塩泉では、その血管拡張効果から温熱浸透効果が高いことが生体への効果を生み出している可能性があると推測している。

心筋症患者に対する温浴の効果：

慢性心不全患者の、温泉治療において、BNPやCRPの低下から、水圧による心筋トレーニング効果と深部体温上昇による血流促進により炎症性サイトカインが身体各所から洗い出され排出が促進していることが考えられる。慢性心不全の心臓リハビリテーションにおいて温泉プール浴の有用性を改めて示しているものと考えてられる。

糖尿病患者における炭酸入浴：

炭酸入浴では、温浴そのものと経皮吸収された炭酸ガスにより、血管拡張が促され、末梢循環が著しく改善されると考えられる。これを繰り返すことで血管内皮機能が改善され末梢動脈が拡張し、血管の柔軟性も改善する可能性がある。炭酸入浴では、血圧への有意な影響は認められていないが、今回の検討では、末梢の細動脈や小動脈への影響に比べ、中大動脈への影響が小さかったからかもしれない。今回の解析では、炭酸浴は、糖尿病患者に対して、血糖降下作用は期待できないが、末梢の動脈硬化の伸展抑制には有効である可能性が示唆された。

線維筋痛症患者への鉱泥浴の鎮痛効果：

鉱泥浴は、比熱が低く、熱伝導効率に優れるため真水の温浴や他種の温泉入浴に比べ、格段に深部体温が上昇する。40℃10分の鉱泥浴でも、入浴後30～60分後も発汗が亢進したままである。このことが、疼痛原因物質の対外排出を促していると考えている。今回の検討では、対象者は、来院前に他院で様々な投薬治療を施された線維筋痛症患者であり、同疾患の中でも特に難治性の部類には要ると考えている。その湯女患者で、疼痛を半分程度に軽減できたことは、同省症治療の中でも、格段に有効な治療と言って良いのではなかろうか。わが国の本症の患者数は200万人程度と言われており、鉱泥浴治療は、線維筋痛症治療の中でも大きな位置を占めると考えている。ただ、退院後鉱泥浴を一切行わない場合、3日から3週間程度で再び疼痛が治療

前のレベルまで再増悪するため、遠方で当院通院できない患者についての対策が問題となっている。

## E. 結論

温泉浴に高血圧、高脂血症、うつ病、慢性肝炎、気管支喘息の予防効果、動脈硬化の伸展抑止効果、慢性疼痛緩和効果、心機能の改善効果、体細胞の抗老化促進効果が伺える調査結果を得た。さらに、慢性心不全、線維筋痛症に対して治療効果も示すことが出来た。高血圧や高脂血症の抑制は動脈硬化性疾患の抑制につながるであろう。同様に慢性肝炎の抑止は、肝硬変、肝がんの抑止につながる。このように二次的に他疾患の発症予防につながる可能性がある、ただこれらは他因子疾患であり、今回の疫学調査で、それが必ずしも確認できていない。

## F. 健康危険情報

目下のところ、温泉利用が、疾病の罹患、増悪などの危険を増大させることを示す証拠は得られていない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(2014年に6報、2015年に5報報告している。(II. 研究成果の刊行に関する一覧表を参照)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

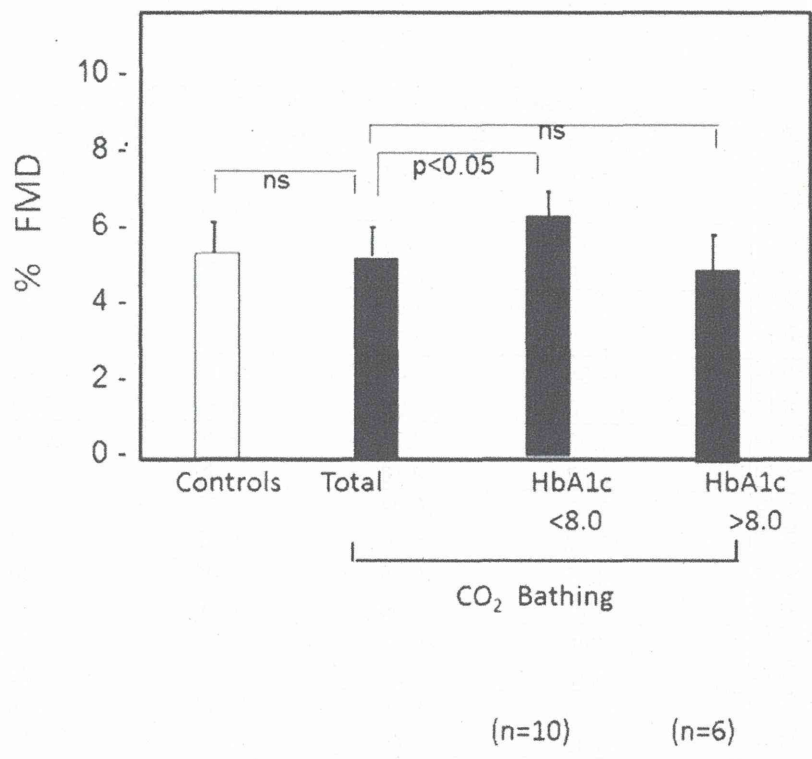


図1 炭酸浴治療による軽症糖尿病患者における前腕血管内皮機能の改善効果

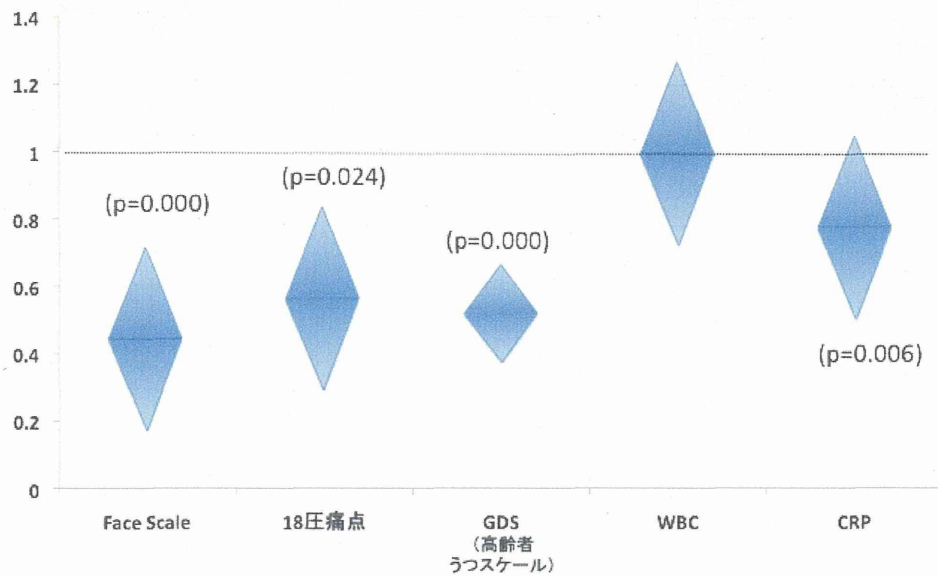


図2 鈣泥浴治療による線維筋痛症患者の疼痛緩和、うつ状態改善、抗炎症効果

表1 温泉利用期間10年未満と40年以上別の連日利用者と非連日利用者間の疾患既往  
赤字は、連日利用と非連日利用の間で有意差のある場合を示している

疾患	温泉入浴頻度	男性(利用<10y)	男性(利用>40y)	女性(利用<10y)	女性(利用>40y)
		既往率(%)	既往率(%)	既往率(%)	既往率(%)
がん	非毎日	13.01	11.44	8.58	10.36
	毎日	12.77	11.61	11.89	8.60
虚血性心疾患	非毎日	9.94	10.63	5.11	5.98
	毎日	7.98	9.26	3.78	4.34
脳卒中	非毎日	4.06	4.90	2.46	2.79
	毎日	2.13	3.79	0.00	1.10
高血圧	非毎日	41.34	41.42	38.11	38.05
	毎日	40.96	37.05	31.89	37.78
不整脈	非毎日	11.60	8.72	7.95	10.96
	毎日	9.57	10.16	8.65	6.62
痛風	非毎日	7.87	10.08	0.50	0.80
	毎日	11.17	6.70	0.00	0.79
喘息	非毎日	3.65	5.45	4.04	5.38
	毎日	4.79	2.90	0.00	2.92
糖尿病	非毎日	18.48	20.98	9.97	10.36
	毎日	16.49	17.97	8.65	9.38
高脂質血症	非毎日	11.10	8.99	13.19	10.16
	毎日	13.83	6.47	15.14	11.12
腎臓病	非毎日	4.56	7.36	2.97	2.79
	毎日	3.19	3.57	2.16	2.52
うつ病	非毎日	1.74	1.09	3.60	2.79
	毎日	1.60	0.78	1.08	1.18
慢性肝炎	非毎日	2.40	0.82	1.64	1.20
	毎日	1.60	2.46	3.24	2.60
膠原病	非毎日	1.49	0.54	3.15	4.18
	毎日	1.06	1.23	3.24	2.68
アレルギー疾患	非毎日	3.81	3.81	7.32	5.98
	毎日	2.66	4.35	11.89	6.31



表2 男性既往疾患別の温泉利用条件（浸漬時間 利用期間）ごとの利用割合

	浸漬<10分	浸漬>20分	期間<10年	期間>40年
全体	24.59	31.41	30.30	27.56
がん	23.53	30.88	32.19	26.14
虚血性心疾患	25.81	30.54	31.40	27.74
不整脈	26.65	28.31	33.88	25.83
高血圧	25.71	30.82	32.50	27.39
脳卒中	24.14	37.93	31.03	32.18
痛風	26.72	33.07	32.54	26.98
喘息	26.01	26.59	32.95	27.17
糖尿病	23.91	33.68	30.46	28.39
高脂血症	25.47	32.24	38.32	21.73
腎臓病	18.64	35.00	28.18	27.27
うつ病	34.62	24.36	33.33	14.10
慢性肝炎	22.68	30.93	32.99	27.84
膠原病	22.06	35.29	32.35	22.06
アレルギー	28.89	25.56	29.44	32.22

全体の平均値と比較して有意差がある場合を赤字で示してある（以下表9まで同じ）

表3 女性既往疾患別の温泉利用条件（浸漬時間 利用期間）ごとの利用割合

	浸漬<10分	浸漬>20分	期間<10年	期間>40年
全体	24.70	32.71	28.79	29.33
がん	26.43	31.48	28.96	30.81
虚血性心疾患	24.30	25.00	32.39	33.10
不整脈	26.53	31.84	30.41	31.22
高血圧	28.20	31.29	29.97	30.61
脳卒中	30.36	32.14	36.61	27.68
痛風	26.00	30.00	16.00	34.00
喘息	28.46	32.11	27.24	29.27
糖尿病	25.12	31.24	29.04	30.30
高脂血症	25.88	31.76	32.42	26.27
腎臓病	24.70	30.12	33.13	30.72
うつ病	22.56	24.39	37.80	20.73
慢性肝炎	21.43	34.82	29.46	36.61
膠原病	24.04	33.65	29.33	26.92
アレルギー	22.82	36.17	34.95	27.67

表4 男性既往疾患別の温泉利用時間帯別の利用割合

	9時前	9～12時	13～18時	19時以降
全体	12.54	10.75	40.46	32.83
がん	9.48	10.95	42.81	33.17
虚血性心疾患	11.18	13.98	41.51	30.75
不整脈	11.78	10.74	44.01	31.40
高血圧	13.21	10.87	43.10	30.11
脳卒中	13.22	17.24	47.13	18.97
痛風	16.40	8.20	43.92	29.10
喘息	13.87	12.14	42.20	28.32
糖尿病	13.22	11.15	41.95	30.46
高脂血症	10.28	9.81	42.76	35.51
腎臓病	12.73	14.55	38.64	29.55
うつ病	8.97	19.23	43.59	24.36
慢性肝炎	12.37	7.22	42.27	35.05
膠原病	16.18	10.29	30.88	41.18
アレルギー	12.22	11.67	37.78	36.67

表5 女性既往疾患別の温泉利用時間帯別の利用割合

	9時前	9～12時	13～18時	19時以降
全体	10.99	10.67	35.61	38.60
がん	10.10	11.78	37.04	37.04
虚血性心疾患	9.15	13.38	37.32	37.68
不整脈	9.18	10.41	39.80	37.35
高血圧	11.39	10.54	37.55	37.04
脳卒中	7.14	18.75	36.61	33.93
痛風	10.00	12.00	44.00	30.00
喘息	11.38	10.98	38.62	34.15
糖尿病	10.68	13.97	36.11	35.16
高脂血症	8.76	9.28	33.99	45.36
腎臓病	9.04	10.84	37.35	39.16
うつ病	10.98	14.63	38.41	27.44
慢性肝炎	13.39	6.25	33.93	42.86
膠原病	15.38	12.02	32.69	34.62
アレルギー	9.47	8.98	31.80	46.84

表6 男性既往疾患別の泉質別の利用割合

	単純温泉	塩化物泉	炭酸水素塩泉
全体	24.80	12.39	3.42
がん	26.14	12.25	2.78
虚血性心疾患	24.95	12.69	4.09
不整脈	24.59	11.36	3.31
高血圧	25.54	11.68	3.04
脳卒中	22.41	7.47	2.30
痛風	24.07	12.17	3.17
喘息	23.70	15.03	2.31
糖尿病	22.99	10.92	2.64
高脂血症	21.50	14.25	1.64
腎臓病	29.09	12.27	3.64
うつ病	19.23	6.41	3.85
慢性肝炎	22.68	10.31	1.03
膠原病	23.53	8.82	4.41
アレルギー	24.44	13.89	2.78

表7 女性既往疾患別の泉質別の利用割合

	単純温泉	塩化物泉	炭酸水素塩泉
全体	23.21	11.65	3.84
がん	25.08	11.78	2.86
虚血性心疾患	19.72	13.38	3.52
不整脈	22.24	12.65	5.31
高血圧	23.45	11.52	3.13
脳卒中	21.43	8.04	5.36
痛風	36.00	10.00	4.00
喘息	25.61	10.98	5.69
糖尿病	24.65	10.36	4.87
高脂血症	24.44	8.63	2.35
腎臓病	24.10	14.46	4.82
うつ病	19.51	7.32	4.88
慢性肝炎	20.54	12.50	2.68
膠原病	27.40	10.10	3.85
アレルギー	24.27	11.41	4.61

表8 温泉連日利用者と非連日利用者の過去1年以内に罹患した疾患数（男性）

	非毎日	毎日
がん	24	24
虚血性心疾患	9	7
脳卒中	0	3
高血圧	16	16
不整脈	3	5
痛風	9	4
喘息	2	1
糖尿病	12	10
高脂血症	3	2
腎臓病	3	2
うつ病	1	0
慢性肝炎	0	0
膠原病	2	1
アレルギー	0	4
全体	2335	2145

表9 温泉連日利用者と非連日利用者の過去1年以内に罹患した疾患数（女性）

	非毎日	毎日
がん	19	13
虚血性心疾患	3	3
脳卒中	1	2
高血圧	45	27
不整脈	5	5
痛風	2	2
喘息	4	3
糖尿病	11	12
高脂血症	8	5
腎臓病	5	1
うつ病	2	5
慢性肝炎	5	0
膠原病	5	4
アレルギー	5	1
全体	3021	2849

表 10 疾病予防効果が期待で切る温泉の利用パターン

	男 性	女 性
高血圧	夜間入浴	毎日 10 分以上
高脂血症	長年の入浴 炭酸水素塩泉	長年の入浴 塩化物泉
うつ病	塩化物泉	塩化物泉
喘息	-	毎日
慢性肝炎	炭酸水素塩泉	-

下線の疾患項目は、年齢により温泉利用の差が生じないような年齢区分でも疾患予防効果が再確認できたもの

表 11 炭酸浴による血圧、脈波の低減効果

	Controls (n=8)	CO <sub>2</sub> bathing (n=16)	
		Pre-CO <sub>2</sub>	post-CO <sub>2</sub>
s-BP(mmHg)	141±14	134±11	134±14
d-BP(mmHg)	76±5.8	80±5.1	82±6.2
%FMD	5.4±.51	5.9±0.53	5.2±0.48
b-IMT(mm)	0.31±0.03	0.32±0.03	0.30±0.02
ABI(Rt)	1.16±0.06	1.23±0.08	1.17±0.06
ABI(Lt)	1.12±0.04	1.25±0.06	1.16±0.85
rt-PWV(m/sec)	1792±128	1840±125	1749±143 <sup>†</sup>
lt-PWV(m/sec)	1821±170	1879±132	1726±122 <sup>†</sup>
CVR-R(%)	2.33±0.17	2.68±0.12	3.65±0.25 <sup>†</sup>
BS(2hr,mg/dl)	148±14	162±12	168±18
HbA1c(%)	7.42 ±0.51	7.71±0.41	7.74±0.38

S-BP; systolic blood pressure, d-BP; diastolic pressure, % FMD: %flow mediated dilation, b-IMT; brachial intima-media thickness, ABI; ankle brachial index, PWV; pulse wave velocity, CVR-R (%); % coefficient of variation of R-R intervals, BS; blood sugar level. Data are means ± SD. \*: p < 0.05 vs control subjects; † : p < 0.05 vs values at before.

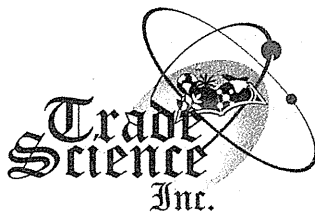
II. 研究成果の刊行に関する一覧表

論文番号	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1	Gardner M, Bann D, Wiley L, Cooper R, Hardy R, Nitsch D, Martin-Ruiz C, Shiels P, et al. Maeda T, von Zglinicki T, Ben-Shlomo Y; Halcyon study team.	Gender and telomere length: systematic review and meta-analysis.	Exp Gerontol	25	15-27	2014
2	Maeda T, Guan JZ, Koyanagi M, Makino N.	Vascular endothelial cell surviving through under prolonged elevated temperature shows persistent or transient up-regulation of telomerase and stress-associated proteins.	Appl Cell Biol	2	1-8	2014
3	Maeda T, Guan JZ, Koyanagi M, Makino N.	X-irradiation alters the telomerase activity and the telomere length distribution of cultured human vascular endothelial cells.	Appl Cell Biol	3	2-9	2014
4	Guan JZ, Guan WP, Maeda T, Makino N.	Changes in telomere length distribution in low-dose X-ray-irradiated human umbilical vein endothelial cells.	Mol Cell Biochem.	396	129-135	2014
5	Maeda T, Guan JZ, Koyanagi M, Makino N.	Altered expression of genes associated with telomere maintenance and cell function of human vascular endothelial cell at elevated temperature.	Mol Cell Biochem.	397	305-312	2014
6	Maeda T.	The questionnaire about the hot spring use and the anamnesis for Beppu residents aged 65 and over.	J Jpn Soc Balneol Climatol Phys Med	77	520-521	2014
7	J-ZGuan, W-P Guan, T Maeda, XG, Wan, N Makino.	Patients with multiple sclerosis show increased oxidative stress markers and somatic telomere length shortening.	Mol Cell Biochem	400	183-187	2015
8	T Maeda, N Makino.	Hot-spring-bathing accelerates wound healing of pressure	Appl Cell Biol	4	1-3	2015

		ulcer of an unconscious patient.				
9	T Maeda, N Makino.	Hot spring footbath is effective for low back pain.	Appl Cell Biol	4	4-5	2015
10	N Makino, T Maeda, N Abe.	Effects of Immersion in Artificial Carbon Dioxide on Endothelial Function Assessed with Flow-Mediated Dilation in Patients with Type 2 Diabetes.	J Jpn Soc Balneol Climatol Phys Med	78	1-9	2015
11	Makino N, Oyama J, Maeda T, Koyanagi M, Higuchi Y, Tsuchida K.	Calorie restriction increases telomerase activity, enhances autophagy, and improves diastolic dysfunction in diabetic rat hearts.	Mol Cell Biochem.	403	1-11	2015

なお、上記のうち特に重要な原著論文を次ページ以降に添付する。(2, 5, 10)

以上



*Applied*

**Cell Biology**

*Regular Paper*

ACB, 3(2), 2014 [48-54]

## Vascular endothelial cell surviving through under prolonged elevated temperature shows persistent or transient up-regulation of telomerase and stress-associated proteins

Toyoki Maeda<sup>1\*</sup>, Guan Jing-Zhi<sup>2</sup>, Masamichi Koyanagi<sup>1</sup>, Naoki Makino<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The Department of Cardiovascular, Respiratory and Geriatric Disease, Kyushu University Beppu Hospital, Beppu, Oita, 874-0838, (JAPAN)

<sup>2</sup>The 309th Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing, (CHINA)

E-mail : maedat@beppu.kyushu-u.ac.jp

Received: 05<sup>th</sup> January, 2014 ; Accepted: 15<sup>th</sup> February, 2014

### ABSTRACT

The effects of heat on vascular endothelial cells are studied. Telomere of human umbilical venous endothelial cells (HUVECs) cultured at 42°C was studied. The expression of several factors concerning to telomere maintenance and vascular endothelial physiology was analyzed.

HUVECs were cultured for 1 day or for 3 days under 42°C. Their telomere lengths and telomere length distributions were analyzed and compared with those at 37°C. The telomerase activity and the expression of telomere-associated RNA, telomere-associated proteins (TERC, TERT, TRF1, and TRF2), heat shock proteins (Hsp60, Hsp70, and Hsp90) and endothelial nitric oxide synthase were also analyzed.

The cell growth was suppressed both on day1 and on day3 at 42°C. Unexpectedly, however, the cell senescence rate was elevated only on day1 at 42°C, compared to that at 37°C. The mean telomere length was not different between at 37°C and at 42°C, whereas in the telomere length distribution long telomere decreased and middle-sized telomere increased only on day1 at 42°C. Telomere-associated proteins, heat shock proteins, and NOS were up-regulated at day1, and the up-regulation disappeared at day3.

The results suggested that long telomeres were affected and various genes are up-regulated in reaction to elevated temperature, and that the cells surviving through the prolonged exposure to heat lose the early responses. The cell subpopulation bearing long telomere seemed more sensitive to heat stress. The observed initial up-regulation of telomere-associated proteins and others showed an aspect of heat responses of vascular endothelial cells. Among the responses, some seemed to be favor for the biological function and the survival of vascular endothelial cell, for example, the upregulation of telomerase activity and the elevated expression of TERT, heat shock protein, and NOS. In addition, an upregulation was maintained uniquely in Hsp70 at a later stage of heat exposure. This observation implicates that the upregulation of Hsp70 play an important roll for cell survival under prolonged heat stress.

© 2014 Trade Science Inc. - INDIA

### KEYWORDS

Vascular endothelial cell;  
Telomere;  
Heat shock protein.



## INTRODUCTION

Telomere consists of repetitive DNA sequence with accessory protein components (TRF1, TRF2, and others) capping the terminals of chromosome<sup>[1]</sup>. It is well known that telomere DNA shortening proceeds at every cell cycle due to a duplication process yielding a little shorter DNA strand. The telomere length of somatic cells is negatively affected by stress factors including oxidative stress<sup>[2]</sup>. Pathological mental and physical stress accelerates telomere attrition<sup>[2]</sup>. Telomere shortening is considered to occur in somatic cells with aging through many rounds of cell cycle and pathological stress<sup>[3]</sup>. On the other hand, there is a telomere-elongating cellular mechanism, which functions in limited cases. Telomerase consists of a protein component of reverse transcriptase (TERT) and a RNA part (TERC). Telomerase contributes the telomere elongation or telomere length maintenance in unique cell population with active mitotic potential, such as cancer cells, stem cells, and reproductive cells. Generally, the telomere activity is, however, suppressed to a low level in the somatic cells, which is not enough to prevent the telomere shortening with cell divisions. Telomerase activity is also affected by stress factors. However, the effect of heat stress on telomere length or telomerase has not been well studied. Heat shock proteins (Hsp) are ubiquitously synthesized in virtually all species and it is hypothesized that they might have beneficial health effects<sup>[4]</sup>. In response to stress stimuli, mammalian cells activate a signaling pathway leading to the transient expression of heat shock proteins (Hsp). Hsp's are a family of proteins serving as molecular chaperones that prevent the formation of nonspecific protein aggregates and assist proteins in the acquisition of their native structures. Physiologically, Hsp's play a protective role in the homeostasis of the vessel wall consisting of endothelial cells and smooth muscle cells<sup>[5]</sup>. Previous reports have shown that heat-associated vasodilatation is associated with vascular NO synthesis<sup>[6]</sup>. Vascular endothelial cells express endothelial nitric oxide synthase (eNOS). eNOS mediates NO synthesis in vascular endothelial cells, which relaxes the surrounding smooth muscle cells of vascular wall to vasodilatation. NO synthesis has been regarded as a functional marker for vascular endothelial cells. We pursued the heat-associated

alteration in the vascular reactivity for vasodilatation of cultured HUVECs by assessing the eNOS expression level of HUVECs under heat-exposure. Heat-associated effects on genomic DNA including telomere erosion, have not been well investigated. Here we analyzed telomere DNA, and the expressions of telomere-associated components, heat shock proteins and nitric oxide synthase in reaction to heat-stress by using vascular endothelial cells in culture exposed to heat.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture

Human umbilical venous endothelial cells (HUVEC) were purchased from Clonetics Corp. (San Diego, CA). The cells were cultured in endothelial cell growth medium (Clonetics Corp.) at 37°C or 42°C and 5% CO<sub>2</sub> in a gelatin-coated flask (Iwaki Glass, 2 Chiba, Japan). Culture media were refreshed every 24 h. On day 1 or 3, the cells were collected and were counted using a hemocytometer. Population doublings (PDs) were calculated using the formula:  $PD = [\log(\text{expansion}) / \log 2]$ , where expansion was the number of cells harvested divided by the initial number of cells seeded.

### Senescence-associated $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) expression

The cells were washed in PBS, fixed for 10 min at room temperature in 2% formaldehyde/0.2% glutaraldehyde, and incubated at 37°C (no CO<sub>2</sub>) with fresh SA- $\beta$ -Gal staining solution containing 1mg/mL of X-gal, pH 6.0 for 12h. One hundred cells were scored from each well (plate) using a light microscope.

### Telomere detection

Telomere detection was performed as previously described<sup>[7]</sup>. Blood cell DNA was extracted from samples and the DNA (0.1 $\mu$ g) were digested with *Msp*I. The digests (10 $\mu$ l) were subjected to Southern blot hybridization with a telomere DNA probe. The autoradiogram was captured on an Image Master, and the telomere length was then assessed quantitatively. Every sample was measured in triplicate.

### Terminal length (TL) analysis

Telomere length distribution was analyzed by com-

## Regular Paper

paring the telomere length using a telomere percentage analysis with three intervals of length ( $>9.4$ ,  $9.4 \geq >4.4$  and  $<4.4$ kb) as defined by a molecular weight standard as previously described<sup>[7]</sup>. The percent of the stratified intensity in each molecular weight range was measured. The mean TL was estimated using the formula  $S(\text{ODi} - \text{background}) / S(\text{ODi} - \text{background} / \text{Li})$ , where ODi is the chemiluminescent signal and Li is the length of the TRF fragment at position i.

### Semiquantitative RT-PCR for TERC RNA

Total RNA samples were extracted using RNeasy Lysis Buffer (Qiagen). mRNA for human telomerase RNA component (TERC) was determined by RT-PCR using a DIG detection system (Roche Applied Science). Each human cDNA was produced by RT-PCR according to each human-derived sequence. For the amplification of  $\beta$ -actin cDNA, the forward primer  $\beta$ -actin (205bp) 5'-CCTTCCTGGGCATGGAGTCCT-3' and the reverse primer 5'-GGAGCAATGATCTTGATCTTC-3' were used according to the published human TERC cDNA sequence<sup>[8]</sup>. And TERC forward primer 5'-TCTAACCCCTAACTGAGAAGGGCGTAG-3' reverse primer 5'-GTTTGCTCTAG AATGAACGGTGGAAAG-3' were used<sup>[9]</sup>. The values for TERC mRNA levels were normalized to the  $\beta$ -actin mRNA level in the same sample. The PCR products were directly synthesized from 2  $\mu$ g of total RNA isolated from each sample using the Superscript one-step RT-PCR system with Platinum *Taq* (Invitrogen) and gene-specific primers according to the recommendations provided by the supplier. The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis (1.3%) followed by staining with ethidium bromide and scanning with Gel-Doc (Bio-Rad). For semiquantitative PCR,  $\beta$ -actin was used as an internal control to evaluate total RNA input, as described by our group<sup>[10]</sup>.

### Western blot and other analyses

Cells from a dish were homogenized with 100  $\mu$ l lysis buffer (100mM Tris pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol containing the protease inhibitor, 1M phenylmethanesulfonyl fluoride, 0.1mM, leupeptin, 0.1  $\mu$ l, and aprotinin, 0.1  $\mu$ l). Gel electrophoresis was used to separate 10  $\mu$ g protein on a 10% SDS-polyacrylamide gel. Proteins were transferred to nitrocellu-

lose membranes (162-0112, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) blocked with 5% dry milk or blocking solution for Western blot (Roche). Membranes were blocked and incubated with antibodies against telomerase reverse transcriptase (TERT) (Rockland), TRF1 (Imgenex), TRF2 (Cell Signaling), Hsp60 (Assay designs), Hsp70 (Assay designs), Hsp90 (Enzo), eNOS (BD Biosciences), phospho-eNOS (Cell Signaling), or glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Santa Cruz Biotechnology). Detection was performed with secondary horseradish peroxidase-conjugated antibodies (Chemicon) and the ECL detection system as previously described<sup>[11]</sup>. The relative expression levels were determined compared to that of GAPDH.

### Telomerase activity

Telomerase activity was examined by means of a modified telomerase repeat amplification protocol (TRAP) method with TeloChaser (Toyobo, Osaka, Japan), as previously described<sup>[12]</sup>.

### Statistical analysis

Assays were repeated three times and analyzed statistically. The normality of the data was examined with the Kolmogorov-Smirnov test and the homogeneity of variance with the Levene Median test. If both the normal distribution and equal variance tests were passed, intergroup comparisons were performed using a two-way analysis of variance (ANOVA) test followed by all pairwise multiple comparison procedures using Tukey's post hoc test. The data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. The criterion for the significance is  $p < 0.05$ .

## RESULTS

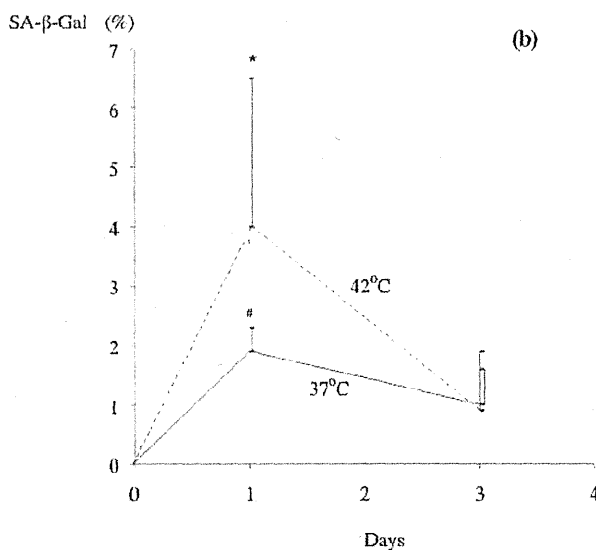
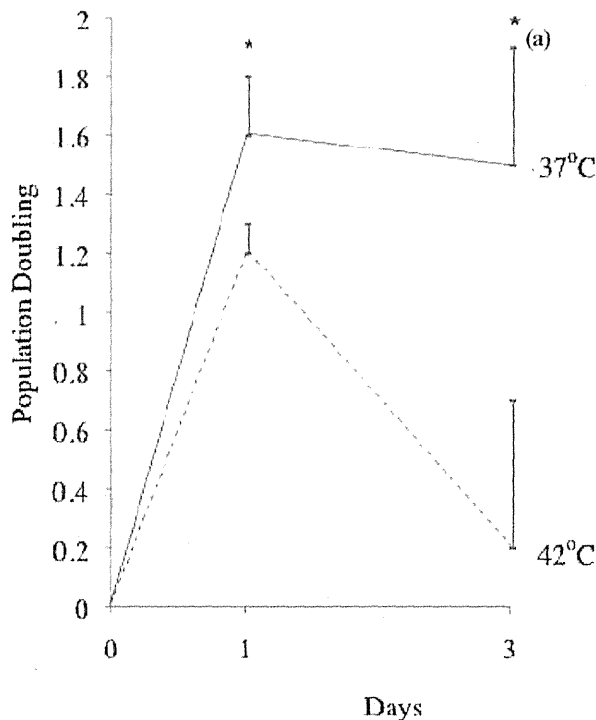
### Population doubling (PD) and cell senescence

The PD of the HUVECs was assessed on day 1 and day 3 of culture. At 37°C, the PD was elevated to  $\sim 1.6$  on day 1 and the PD value was maintained on day 3. At 42°C, initially the PD was elevated to  $\sim 1.2$ , but decreased steeply to  $\sim 0.2$  on day 3 (Figure 1a).

Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) expression was observed in  $\sim 2\%$  of cells on day 1 and  $\sim 1\%$  on day 3 at 37°C, and  $\sim 4\%$  on day 1 and

~2% on day3 at 42°C (Figure 1b).

The PD value did not increased at 37°C, and decreased at 42°C during day1 and day3. This apparent suppress of cell growth might be derived partly from



a. The PD on day1 and day3 at 37°C and 42°C. The horizontal bars are standard deviations. \* $p < 0.05$ , at 37°C vs at 42°C on day1. b. The percentages of SA- $\beta$ -Gal-positive cells. \* $p < 0.05$ , at 37°C vs at 42°C. # $p < 0.05$ , on day1 vs on day3.

Figure 1 : The population doubling (PD) and the ratio of senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) staining of HUVECs cultured in the presence of  $H_2O_2$

damaged subpopulation during cell preparation before starting culture being left. The elevated cell senescence on day1 both at 37°C and at 42°C supported this idea. The difference between PD and cell senescence were derived from heat stress, and cells were suppressed in growth potential at 42°C. Cell population survived through the heat condition of 42°C for 3 days bore a similar proportion of senescent cells as at 37°C. This indicated that heat-sensitive cells were completely eradicated during day1 and day3 at 42°C. As a result, heat-durable cells survived on day3 at 42°C.

#### The mean TRF level and its distribution

The mean TL's of HUVECs were measured to assess how much high temperature condition affected the telomeric DNA (TABLE 1). At 42°C, long telomere (>9.4kb) decreased on day1 and middle-sized telomere (9.4kb-4.4kb) increased. These differences between 37°C and 42°C disappeared on day3. The proportions between values at 37°C and those at 42°C were also compared to pursue the heat-specific changes from day1 to day3 (TABLE 2). The decrease of long telomere and the increase of middle-sized telomere were observed only on day1 and the short telomere (<4.4kb) was not significantly affected. These changes of TL distribution disappeared on day3. Unexpectedly, cells with longer telomere seemed more easily affected by heat stress, compared to those with shorter telomere.

TABLE 1 : The telomere length and the telomere length distribution of HUVECs exposed to heat

	37°C		42°C	
	Day1	Day3	Day1	Day3
MspI-TL(kb)	9.2±1.0	8.7±0.3	8.3±1.0	8.9±0.6
>9.4kb(%)	51±8	46±1	39±11*	49±5
9.4-4.4kb(%)	47±6	51±2	59±10*	48±3
<4.4kb(%)	2±3	3±2	2±1	4±2

\*37°C vs 42°C  $p < 0.05$

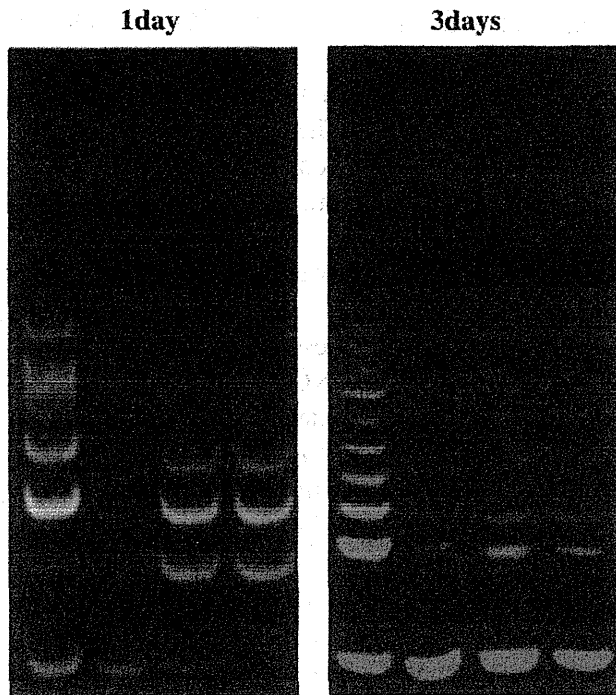
TABLE 2 : The proportional values of telomere length parameters at 42°C compared to those at 37°C

	Day1	Day3	p-value
MspI-TL	0.90±0.11	1.02±0.07	0.06
>9.4kb	0.76±0.21	1.06±0.10	0.01
9.4-4.4kb	1.26±0.20	0.93±0.06	0.01
<4.4kb	1.01±0.74	1.21±0.69	0.63

Regular Paper

Telomerase activity

The telomerase activity of HUVECs at 37°C and 42°C was evaluated by TRAP assay (Figure 2). Average value of TPG at 37°C was put as 1(1±0.66 for 1day, 1±0.2 for 3days). The relative TPG7s at 42°C were 1.32±0.84 on day1 and 0.57±0.28 on day3. Thus, the relative telomerase activity of HUVECs at 42°C was maintained on day1 (p= 0.71) but significantly decreased on day3 (p=0.03). Telomerase activity decreased under prolonged heat stress at 42°C.



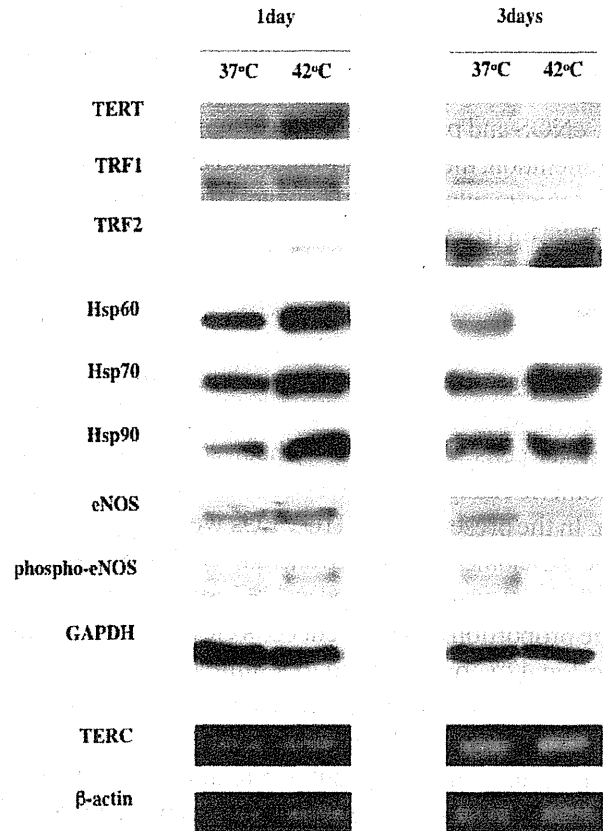
PC NC 37°C 42°C PC NC 37°C 42°C  
The photographs of representative TRAP assay results are shown. The materials used for the positive control (pc) and negative control (nc) were provided with the kit

Figure 2 : The telomerase activity of endothelial cells in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Expression of telomere-associated components and others

All the three telomere-associated components (TERT, TRF1, and TRF2) except TERC were up-regulated on day1, thereafter were down-regulated on day3. TERC did not seem to be affected by heat in the expression. (Figure 3, TABLE 3).

All the analyzed heat shock proteins (Hsp60, hsp70, and hsp90) were up-regulated at 42°C on day1 and



The representative Western blot results of telomere-associated proteins (TERT, TRF1, and TRF2), heat shock proteins (Hsp60, Hsp70, and Hsp90) and a TERC RNA RT-PCR result are shown. The relative expression level of each component is shown in TABLE 3

Figure 3 : The expression levels of TERC, telomere-associated proteins, heat shock proteins, and NOS of HUVECs cultured on day1 and day3 at different temperatures

TABLE 3 : The proportional values of the expressions of the telomere-associated components, heat shock proteins and eNOS at 42°C compared to those at 37°C

	Day1	Day3	p-value
TERT	1.80±0.32	0.25±0.14	0.01>
TRF1	1.43±0.19	0.44±0.25	0.01>
TRF2	3.93±1.45	1.19±1.07	0.06
Hsp60	2.35±0.58	0.17±0.11	0.02
Hsp70	2.73±0.08	1.46±0.08	0.00
Hsp90	3.35±1.43	0.89±1.46	0.08
eNOS	2.43±0.52	0.25±0.04	0.02
TERC	0.95±0.27	1.86±1.66	0.44

The photo results are shown in Figure 3. The relative expression levels were determined by the proportion of each band density to that of β-actin or GAPDH (set at 1 each), β-actin (RNA) for TERC and GAPDH (protein) for western results