

# 448kHzの電気刺激によって促進されるヒト間葉系幹細胞の増殖

## Electric Stimulation at 448 kHz Promotes Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells

María Luisa Hernández-Bule Carlos Luis Paíno María Ángeles Trillo

Alejandro Úbeda

Departamento de Investigación-BEM, Hospital Universitario Ramón y Cajal - IRYCIS, Madrid, Spain

### キーワード

高周波・ADSC・増殖・PCNA・MAPK

### 概要

**背景/目的:** 容量性/抵抗性電移法 (CRET) は、筋骨格病変の治療に400kHz – 450kHzの周波領域の電流を用いる非侵襲的な電熱治療法である。電流および電界または磁界が組織の再生に関わる増殖、分化、またはその双方のプロセスに影響を与えうるという科学的根拠がある。本研究では、組織修復に対するCRETの効果の根拠となる可能性がある増殖反応を検討した。**方法:** CRETセラピーに現在使用されている448kHzの電気信号 $50\mu\text{A}/\text{mm}^2$  (非温熱量) での短時間の反復 (5分通電/4時間休止) *in vitro* 刺激後の健康なドナーの脂肪由来幹細胞 (ADSC) の生存率、増殖、分化を評価するために、XTTアッセイ、フローサイトメトリー、免疫蛍光、ウェスタンブロットによる分析を実施した。**結果:** この処理はPCNAおよびERK1/2の上方制御、ならびに細胞周期のS期、G期、M期のADSC画分の有意な増加を誘発し、また、細胞増殖率を上昇させた。この増殖効果はその後の脂肪分化、軟骨分化または骨分化のADSCの多分化能を損なわなかった。**結論:** これらのデータは、CRETに対する反応の基礎となる可能性のある細胞および分子現象を特定し、CRETに誘発される病変修復が、損傷した組織に存在する幹細胞の増殖の促進に媒介される可能性を示している。

Copyright © 2014 S. Karger AG, Basel

## はじめに

組織の再生は、生化学的信号の複雑なネットワークにより機能が制御される様々な種類の細胞が関わる複雑なプロセスである。再生のきわめて重要な段階の一つは前駆細胞の増殖段階である。増殖後、前駆細胞は特徴的な細胞外マトリックスを構築する組織特異的細胞に分化し、その結果本来の機能が回復する。間葉系幹細胞（MSC）は損傷修復の増殖期に関わる重要な細胞集団であり、ほぼすべての成体組織に存在する。これらの多能性細胞は、それらの自己再生能力および複数のタイプの細胞に分化する能力、また、損傷修復時の炎症および免疫反応でのそれらの役割により、再生医療における有用なツールであることが示されてきている[1,2]。これらの理由から、損傷した組織に存在するMSCの増殖および分化を促進する方法の開発が、今日、再生医療における主要な関心対象となっている。

また、細胞および組織は、静止膜電位、イオン電流、キャパシタンス、抵抗、誘電率、導電率など、特異的な電気的特性を持つ[3]。組織の種類、年齢、生理学的状態により変動し、発達組織、正常組織、損傷した組織で異なるこうした特性が、外因性の電場および電磁場への生物系の反応を可能にする[4-6]。薬物または物理作用への曝露による内因性の電気現象の変化が、多様な組織における修復率に影響を与えることが示されている（総説は Messerli, Graham, 2011およびCostin et al., 2012を参照）[7,8]。

従来、電気的または電磁氣的刺激を利用した理学療法は、美容医学でも同様に、外傷性、または変性の組織の損傷の修復に有効な結果を出してきた[7, 9-14]。特に、電気的刺激は慢性損傷の回復および再生を大幅に改善し、しばしば他の治療法で効果がなかった創傷の完全な閉鎖をも実現することが示されている[15-18]。組織レベルでは、電気的刺激が血流を改善し[19]、損傷を受けた組織の弾性を増加させ[20,21]、腫脹を抑制する[21]可能性が報告されている。細胞レベルでは、電気的刺激は接着、配向、移動に影響し[22-25]、様々な種類の幹細胞の分化と増殖に関わる形態学および表現型プロセスの制御に影響を及ぼす[3,26-29]。電気的刺激によって誘発される組織再生の基礎となる基本的現象はまだ確定されていないが、休止状態、阻止状態または復帰状態の再生の場合、電気治療が、正常な組織の修復に関わる内因性の生体電流により誘発される細胞反応と同質の細胞反応を引き起こす可能性が提示されている[7, 30]。

容量性 / 抵抗性電移法（CRET）は、400kHz - 450kHzの高周波（RF）領域の電流の適用に基づく非侵襲性の電熱治療である。組織の電気抵抗により、CRET電流は標的とした器官の温度上昇を誘発することができる。循環血が隣接領域に熱を拡散し、施術対象構造の温度を希望の範囲内に保ち、周辺組織の不要な高熱を避ける。最近の*in vitro*の結果は、温熱性の電流密度で適用したCRETがヒト癌細胞で細胞傷害性を引き起こすこと、こうした温熱効果が、標的とする腫瘍組織への金属微小粒子注入により増強される可能性があることを示している[31]。しかし、少なくとも細胞レベルで、CRETの効果は温熱効果に限定されないことを示す根拠がある。実際に、我々のグループの以前の研究では、非温熱量のCRETの刺激は、培養ヒト腫瘍細胞株で増殖抑制および細胞傷害反応を誘発しうるが、初代培養

ヒト末梢血単核細胞では誘発しないことが示されている[32-36]。これらの結果は、CRET医学療法の効果が、曝露された組織の温度上昇のみによるのではなく、電気的刺激自体への直接的な細胞反応にもよるという根拠の実験的裏付けと解釈することができる。

組織の再生に関して、CRETセラピーは、現在、リハビリテーションやスポーツ医学の分野で筋肉、骨、靭帯、腱の損傷の治療に利用され[37-39]、また、喘息[40]および血管病変[41]の治療に利用されて効果を上げている。再生医療で現在使用されているその他の温熱治療とは異なり、CRETは、腫脹および真皮や表皮の火傷といった副作用を引き起こさない。臨床研究で、CRETによる損傷回復の促進は、抗炎症プロセス、鎮痛、筋機能回復と共に、損傷を受けた領域の拡大の全体的な縮小に関わっていることが示されている[42-45]。CRETのこれらの臨床効果は、再生プロセスに関わる細胞現象の増強と一致すると思われる。本研究の目的は、細胞増殖の促進がCRETに誘発される組織の再生に関わる現象の一つであるかどうかを検討することである。この目的のため、我々は、健康なヒトドナーから採取したMSCの一種である脂肪由来間質細胞（ADSC）の増殖に対するCRET電気的刺激の*in vitro*での影響を検討した。本論文に述べる結果は、50 $\mu$ A/mm<sup>2</sup>、非温熱量、448kHzの正弦波信号の短いパルスによる反復刺激がADSCの増殖を促進することを示している。こうした増殖反応は細胞周期進行の活性化を伴い、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ - 細胞外シグナル制御キナーゼ1/2（MAPK - ERK1/2）のシグナル伝達経路の上方制御により媒介される。損傷修復におけるCRETセラピーの有効性を少なくとも部分的に裏付け説明する実験的根拠を示すことにより、これらの結果が、RF電流への曝露に基づいた電熱治療の適用の潜在的な拡大だけでなく標準的なCRET処置の最適化に大きな影響をもつ可能性がある。

## 材料および方法

### 細胞培養

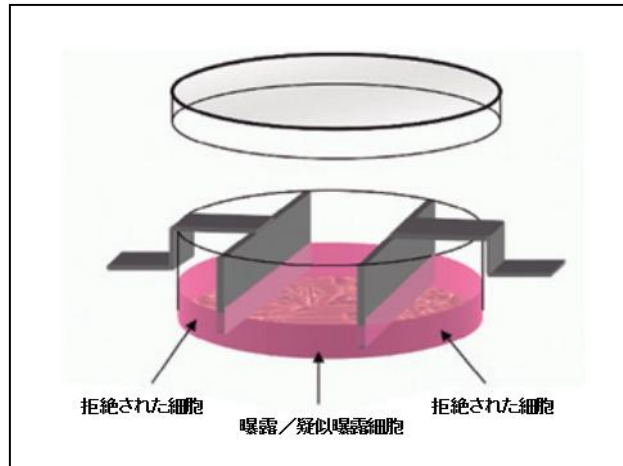
脂肪由来幹細胞は、4名の健康なドナー（年齢65歳、69歳の男性2名、29歳、35歳の女性2名）から一般外科手術時に予備の組織として得た皮下脂肪サンプルから分離した。本研究と手順はラモン・イ・カハル大学病院（マドリッド、スペイン）の臨床研究倫理委員会によって評価および承認され、ボランティアはインフォームドコンセント文書で組織の提供を承認した。0.5-1cm<sup>3</sup>の脂肪組織片は、線維組織、目に見える筋膜、血管を取り除き、外科用メスを使用して1 - 2mm<sup>3</sup>の小立方体片に切断した。組織片は、ハンクス平衡塩類溶液（HBSS, Hyclone, South Logan, Utah, USA）中1 mg/mlのコラゲナーゼA（Roche Applied Science, Basel, Switzerland）を用いて37°Cで40分間穏やかに攪拌しながら消化した。コラゲナーゼ活性を、高グルコースD-MEM中ウシ胎児血清（Biowhittaker, Verviers, Belgium）で停止した。次に、細胞解離をP1000およびMultiGuardバリアーピペットチップ（Sorenson BioScience, Salt Lake City, UT, USA）を使用して行った。組織または血管の解離していない大きな塊を滅菌した遠心管の底に2分間沈降させた。収集した細胞分散物を別の遠心管に移し、300 x gで

5分間遠心分離して細胞の血管間質画分をペレット化した。上清および脂肪細胞の浮遊層を吸引した後、ペレットを1%グルタミン(Gibco)、1%ペニシリン-ストレプトマイシン(Gibco)を添加したMesenPro培地 (MesenPro-RSTM, Gibco, Invitrogen, Camarillo, CA, USA) に再懸濁し、75cm<sup>2</sup>のTフラスコ (Falcon) に直接播種した。48時間後、フラスコをHBSSで2度すすいで全ての細胞破片および未接着細胞を除去し、MesenPro培地を供給した。2日後すなわち4日目に培地を交換した。コンフルエントとなった7日目に、HBSS中0.05%トリプシン+0.02%EDTA (Sigma, Saint Louis, MO, USA) で細胞を剥離し、670 cells/cm<sup>2</sup>濃度で新しいフラスコに播種して、培養細胞を継代した。培養細胞がコンフルエンスに達した時点で細胞を収集し、アリコートに10%DMSO (Sigma) /90%ウシ胎児血清 (Gibco, Invitrogen, Paisley, Scotland, UK) 中で凍結した。第3~8継代のADSCを本実験に使用した。細胞は、細胞計数用に60mm径のペトリ皿 (Nunc, Roskilde, Denmark) に725 cells/cm<sup>2</sup>の濃度で、あるいはXTTアッセイ、免疫蛍光法またはウエスタンブロット法用に1360 cells/cm<sup>2</sup>の濃度でプレーティングした。免疫蛍光検査用に細胞をペトリ皿に入れたカバーガラス上に播種した。

## CRET曝露

曝露システムは以前の論文[33,34]に記載した。簡単に説明すると、電流への曝露は、*in vitro*通電用に特別に設計されペトリ皿内に装着した滅菌ステンレス製電極対により行った。図1に示した通り、曝露についてペトリ皿中の別個の2細胞群で検討した。電極ギャップ間のペトリ皿表面で増殖する細胞を均一な電流密度に曝露 (または疑似曝露) し、一方で、それぞれの電極および皿の壁で区切られた領域にある細胞は不均一な電流密度に曝露 (または疑似曝露) するものとした。従って、電極ギャップ間の長方形の面 ( $l = 43.5\text{mm}$ ,  $w = 24.5\text{mm}$ ; 面積 =  $1065\text{mm}^2$ ) で増殖する細胞のみを本研究に使用し、残りの細胞は廃棄した。CRET曝露のため、電極対を1台の信号発生装置 (Indiba Activ HCR 902モデル, INDIBA®, Barcelona, Spain) に直列に接続した。疑似曝露用に、コントロールのペトリ皿に装着した1対の電極も発生装置に接続したが、通電はしなかった。通電パターンは、 $50\ \mu\text{A}/\text{mm}^2$ 、非温熱性密度、448kHzの正弦波電流の5分間パルスを合計48時間に4時間間隔で構成した。こうした曝露パラメータは我々のグループの以前の研究[32-36]で細胞増殖に影響することが検証されている。培養細胞は2台の別の同一のCO<sub>2</sub>インキュベーター (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 中で増殖させた。インキュベーター内の雰囲気条件 (37°C、90%相対湿度、5% CO<sub>2</sub>) と同様に通電パラメータを常時モニターした。インキュベーター内の電磁環境は、3種類の目的周波領域である静電気 (DC, Bartington モデルMag-03, GMV associates, San Carlos, CA, USA)、電力周波数 (50 Hz AC, EFA-3 モデル BN 2245/90.20, Wandel & Goltermann, Eningen, Germany)、高周波数 (RF < 3 GHz, 外部PMM EP-330型電界プローブ付きPMM 8053型携帯式電界強度計, 共にNarda Safety Test Solutions, Milan, Italy) 用の特別な磁力計を使用してモニターした。得られた平均値は、BDC:  $24.4 \pm 3.4\ \mu\text{T rms}$ 、BAC:  $5 \pm 3\ \mu\text{T rms}$ 、RF: 磁力計の検出限界未満であった。

図 1. 2 個の電極間に流れる 448kHz の電流への *in vitro* 曝露。電極ギャップ間（曝露／疑似曝露領域で、1065 mm<sup>2</sup>）のペトリ皿表面の電流密度は均一。それぞれの電極とペトリ皿の壁の間の空間にある細胞は曝露されていないとみなした。それらの細胞をペトリ皿からかき取り、処理終了後直ちに廃棄した。



### 間葉系特性評価のための分化アッセイ

採取したADSCの多分化能を評価するために、細胞を60mm径のペトリ皿内に2270 cells/cm<sup>2</sup>という高濃度で播種し、脂肪生成培地、軟骨形成培地、または骨形成培地中で培養した。この3種類の培地は、10%ウシ胎児血清 (Gibco)、1%グルタミンおよび1%ペニシリン-ストレプトマイシン (Gibco) を添加した高グルコースD-MEM (Biowhittaker) で構成される共通の基盤をもっていた。脂肪生成培地には、0.25mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチン (IBMX, Gibco)、200 μMインドメタシン (Sigma)、10μg/mlインスリン (Sigma)、1μMデキサメサゾン (Sigma) を添加した。軟骨形成培地の特異的な添加物は、150nMアスコルビン酸2-リン酸 (Sigma)、10ng/ml TGF-β1 (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA)、10μg/mlインスリン、100nMデキサメサゾンで構成した。骨分化のための基礎培地には、10ng/ml BMP-2 (Invitrogen, Camarillo, CA, USA)、100nMデキサメサゾン、50μMアスコルビン酸2-リン酸、10mM β-グリセロリン酸 (Calbiochem, Darmstadt, Germany) を添加した。それぞれの分化培地中での培養15日目に、ADSCを4%パラホルムアルデヒド中で固定し、脂肪分化の評価のためにオイルレッドO (Sigma) で、軟骨形成についてアルシアンブルー (BDH, Poole, UK)、または骨形成についてアリザリンレッドS (Sigma) で染色した。

分化評価と同じ手順を、ADSCの多分化能がCRET曝露の影響を受けるかどうかについての検討に応用した。通電または疑似通電後、培養細胞を脂肪生成、軟骨形成または骨形成培地中で2週間培養し、その後固定して、それぞれオイルレッド、アルシアンブルーまたはアリザリンレッドで染色した。

### 細胞計数

第2～8継代の培養細胞を使用した。各回の実験で、CRETで通電した培養細胞5検体および疑似曝露した培養細胞5検体を60mm径のペトリ皿にプレーティングした。48時間の

処理後に細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、PBS 中 0.1%Triton で透過処理し、細胞核を  $10^{-5}$  M ビスベンズイミド H 33258 (Sigma) で蛍光染色した。2 個の電極によって区切られた  $1065\text{mm}^2$  の長方形内のペトリ皿表面の細胞数を Olympus IX-70 蛍光顕微鏡で評価した。10 倍の対物レンズを使用し、 $1.25\text{mm}$  の平均距離で隔てた 24 顕微鏡視野 ( $840\mu\text{m} \times 630\mu\text{m}$ ; 面積  $0.5292\text{mm}^2$ ) をランダムに選択、撮影、分析した。1 視野に含まれる交差面積の少なくとも半分を有する核を計数し、曝露領域内の全細胞数をこうした計数から推定した。

### XTT増殖アッセイ

細胞増殖に対するCRETの影響をXTTアッセイ (Roche) で確認した。第3~7継代の細胞を使用した。各回の実験で10枚のペトリ皿 (CRET曝露用5枚、コントロール用5枚) にプレATINGした。48時間のCRET処理または疑似通電後、均質な曝露領域内で増殖した細胞を、テトラゾリウム塩XTTとともに $37^\circ\text{C}$ および6.5%  $\text{CO}_2$ 雰囲気中で3時間培養した。XTTは代謝活性細胞により着色したホルマザン化合物に還元され、これをマイクロプレートリーダー (TECAN, Männedorf, Switzerland) を用い波長 $492\text{nm}$ で定量した。得られた値は活性細胞の数に直接相関した。全28回の反復実験を異なる継代の培養細胞を用いて行った。

### プロモデオキシウリジン取り込みアッセイ

細胞増殖およびDNA合成に対する電氣的刺激の影響を5-プロモデオキシウリジン (BrdU) 取り込みの免疫蛍光検出で評価した。第3~5継代の細胞を  $60\text{mm}$  径のペトリ皿中の電極ギャップ間に置いた  $12\text{mm}$  径のカバーガラス対上に播種した。最後の 6 時間の疑似または CRET 処理中、培養細胞を  $3\text{mM}$  BrdU (Sigma) の存在下で培養した。その後、細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、エタノール : 酢酸 (95:5) で 10 分間  $4^\circ\text{C}$  で透過処理した。カバーガラスをマウスモノクローナル抗 BrdU 抗体 (1:20, Dako, Glostrup, Denmark) とともに  $4^\circ\text{C}$  で一夜培養し、その後、Alexa Fluor 568 結合抗マウス IgG (1:500, Molecular Probes, Invitrogen, Camarillo, CA, USA) とともに室温で 1 時間培養して免疫蛍光染色した。細胞核は、退色防止 p-フェニレンジアミンを含む封入剤 (Sigma) に添加したビスベンズイミド H 33258 (Sigma) で蛍光染色した。これらのカバーガラスを Nikon Eclipse TE300 蛍光顕微鏡で分析した。4 回の反復実験を実験群につき 4 枚のカバーガラスを用いて行った。核および BrdU 陽性細胞 (BrdU+) の総数を体系的ランダムサンプリングによって選択した視野内で計測した。カバーガラス 1 枚につき合計 15 視野について検討した。画像を記録し、AnalySIS 3.1 ソフトウェア (Soft Imaging Systems GmbH, Münster, Germany) で分析した。

## 細胞周期分析

細胞周期に対する通電の潜在的な効果は、第3および4継代の培養細胞を使用したフローサイトメトリーで評価した。通電または疑似処理終了時に、電極ギャップ内で増殖した細胞をトリプシン (Sigma) で剥離し、エッペンドルフチューブ中に収集して、1mlの70%エタノール中4°Cで一夜固定した。ペトリ皿1枚につき約 $1 \times 10^5$ 個の細胞のサンプルをPBSで2度洗浄し、3.4mMのクエン酸塩緩衝剤にリボヌクレアーゼA (200ng/ml; Boehringer) を添加した $20 \mu\text{g/ml}$ のヨウ化プロピジウム染色溶液 (Boehringer, Ingelheim, Germany) とともに暗所、室温で1時間培養した。細胞をフローサイトメトリー (FACScalibur, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) で分析した。サンプルにつき10,000の事象をCellQuest 3.2ソフトウェア (BD Biosciences) を使用して得た。合計4回の反復実験を行った。反復実験につき10サンプル (CRET処理5検体、疑似曝露5検体) を分析した。

## PCNA免疫蛍光

増殖細胞核抗原 (PCNA) はDNAポリメラーゼ関連タンパク質で、細胞周期のS期およびG2期の細胞のマーカーとして最近利用されている[46]。第3~5継代の培養細胞をカバーガラス上に播種し、上述のとおりCRETまたは疑似曝露した。細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、エタノール:酢酸で透過処理し、抗PCNA抗体 (Santa Cruz Biotechnologies, TX, USA) とともに4°Cで一夜培養し、Alexa Fluor 488結合抗マウスIgG (Molecular Probes) で室温で1時間蛍光染色した。細胞核をビスベンズイミドH 33258で対比染色した。実験群につき4枚のカバーガラスを用いる4回の反復実験を行った。PCNA陽性細胞の割合をBrdUアッセイについて上に記載したように推定した。

## ウエスタンブロット法

第3~5継代の細胞を使用した。CRET または疑似曝露時間終了時に、電極ギャップ内にあった細胞をペトリ皿からかきとり、PBS に再懸濁し、1200rpm で5分間遠心分離した。得られたペレットは、10mM トリス塩酸、10mMKCl、1mM ジチオスレイトール、1mM EDTA、1mM PMFS、 $10 \mu\text{g/ml}$  ロイペプチン、 $5 \mu\text{g/ml}$  ペプスタチン、100mMNaF、20mM  $\beta$ -グリセロリン酸、20mM モリブデン酸ナトリウム、0.5% Triton X-100、0.1% SDS を含有するバッファー中4°Cで溶解した。溶解物を10000rpm で室温で5分間遠心分離し、上清中のタンパク質濃度をブラッドフォード法で測定した。タンパク質をドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分析し、セミドライ転写法 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて Hybond ECL ニトロセルロースメンブレン (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) に転写した。メンブレンを5%スキムミルク含有PBS でブロッキングし、ブロッキングバッファー (PBS 中0.1%Tween および5%スキムミルク) で双方とも1000:1に希釈したウサギ抗PCNA抗体またはウサギ抗ホスホ ERK1/2抗体 (Invitrogen) 、およびローディングコ

ントロールとしてのマウス抗 $\beta$ -アクチン (1:5000; Sigma) 中、4°Cで一晩培養した。メンブレンをその後 PBS-Tween で4度洗浄し、その後 IRdye800 CW に結合したヤギ抗ウサギ IgG (1:10000 希釈、LI-COR Biosciences, NE, USA) および IRdye 680 LT 結合抗マウス IgG (1:15000 希釈、LI-COR Biosciences) とともに室温で1時間培養した。プロットの蛍光強度を LI-COR Odyssey スキャン (LI-COR Biosciences) で測定し、Bio-Rad 社の Quantity One ソフトウェア、バージョン 4.6.7 を使って評価した。PCNA タンパク質について5回の反復実験およびリン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) について3回の反復実験を行った。反復実験につき8サンプル (疑似曝露4検体、CRET 曝露4検体) を分析した。PCNA と p-ERK1/2 の値をローディングコントロールに対して正規化した。

## 統計分析

特に記載しない限り、データは、San Diego, CA, USAのGraphPad Prismソフトウェアを使用してスチューデントの両側独立t検定によって分析した。サンプル間の差は $P < 0.05$ で統計的に有意とみなした。

## 結果

### ADSCの脂肪分化、軟骨分化、骨分化

ADSCを脂肪細胞、軟骨細胞または骨細胞への分化能について評価した。分化培地中で2週間後に、この3種の細胞系統への明確な分化パターンがみとめられた (図2)。

### 細胞数に対するCRETの影響

ビスベンズイミドで標識した核の数は、CRETの影響が培養継代に依存することを示した。確かに、第3~5継代でCRETで処理した培養細胞は、第5継代で疑似曝露したコントロールよりも最大25%の細胞数の統計的に有意な増加を示した (図3A)。反対に、非常に初期の継代 (P2) では細胞数の増加は顕著でなく、細胞が老化の兆しを示し始めた後期継代 (P7,P8) では細胞数の減少さえ起こっていた可能性がある。XTT比色アッセイで、第3~5継代で通電した培養細胞でコントロールに対して最大20%の細胞数の増加が確認された。また、細胞数の統計的に有意な減少が第7継代でCRETに曝露したサンプルで検知された (図3B)。

### DNAへのBrdU取り込みによる細胞増殖に対するCRETの影響の評価

48時間のCRET処理または疑似曝露後の増殖細胞数をBrdUの取り込みで確認した。通電した群のBrdU陽性細胞の割合は、コントロールでの割合よりも38%有意に増加した ( $p <$



0.001, スチューデントのt検定、図4)。これは、CRETにより誘発され、ビスベンズイミドおよびXTTアッセイにより示された細胞数の増加が、少なくとも部分的に細胞増殖の促進によって媒介されたとみられることを示している。

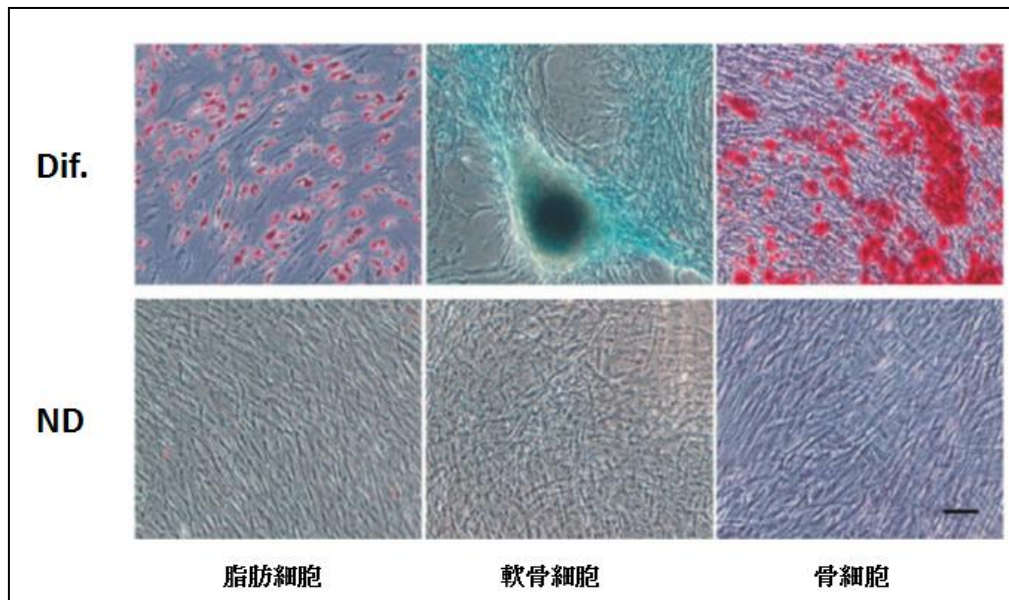


図 2. ADSC の特性評価のための多分化能アッセイ。脂肪生成培地、軟骨形成培地、骨形成培地を添加した場合 (Dif)、脂肪組織から分離した細胞は相応する細胞系統へ分化したが、添加していない場合 (ND)、細胞は未分化のままであった。スケールバー=100 $\mu$ m。

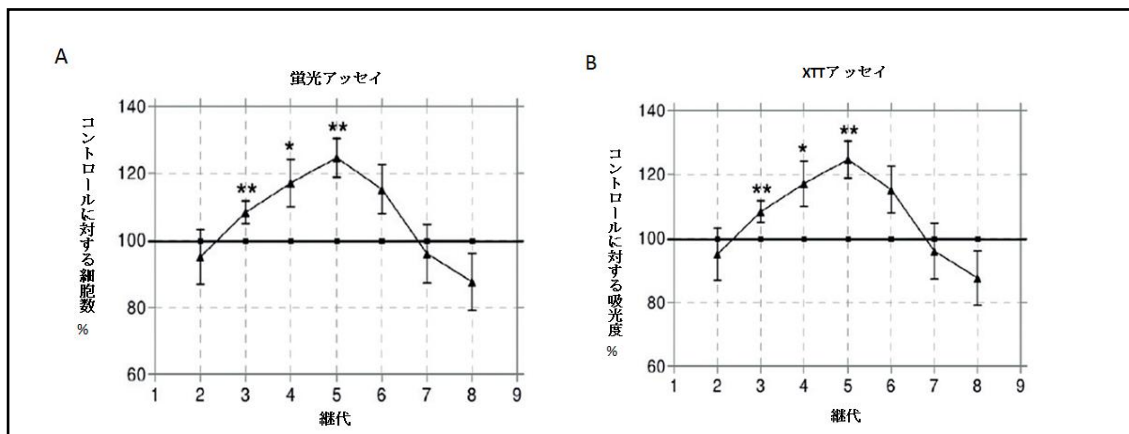
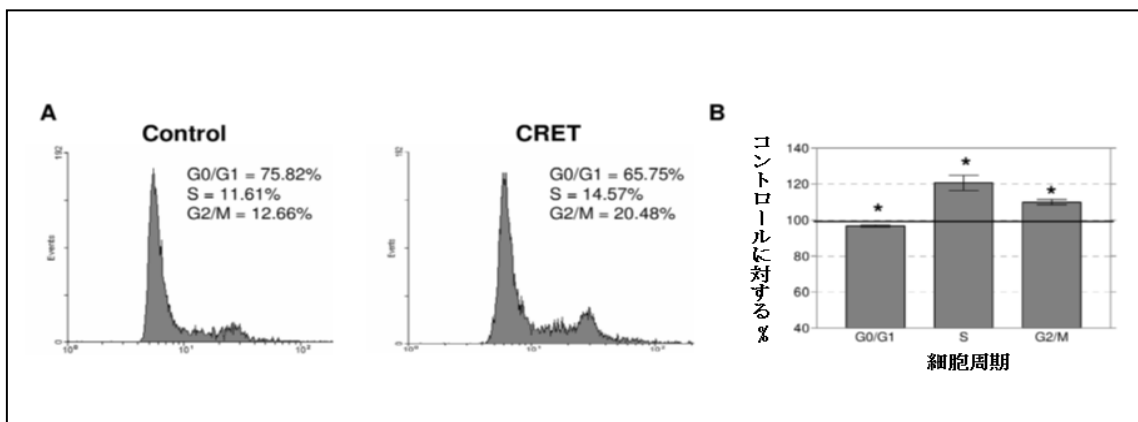
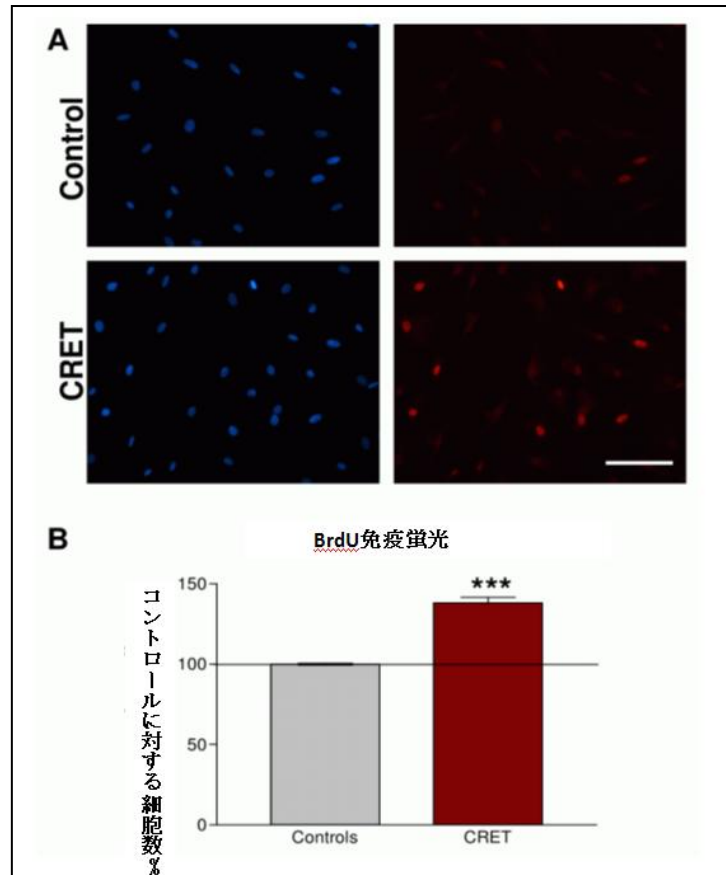


図 3. 増殖アッセイ。(A)第 2~8 継代の培養細胞のビスベンズイミド染色細胞核の蛍光顕微鏡法による計数。継代につき 2~4 回の反復実験を行った。点は顕微鏡視野ごとの細胞の平均 $\pm$ SEM を示す；データはそれぞれのコントロールサンプルに対して正規化している。(B) 第 3~7 継代の培養細胞の細胞増殖についての XTT アッセイ。継代につき 3~8 回の反復実験を行った。対応するコントロールに対するパーセンテージでの平均 $\pm$ SEM。\* 0.01 $\leq$  p  $\leq$  0.05; \*\*0.001 $\leq$  p  $\leq$  0.01; \*\*\* p < 0.001 (スチューデントの t テスト)。

## 細胞周期に対する CRET の影響

細胞周期に対する CRET 処理の潜在的な影響を、ヨウ化プロピジウムを用いるフローサイトメトリーで評価した。第 3～5 継代の細胞を使用した 4 回の反復実験から得たデータの分析は、S および G2/M 期の細胞の統計的に有意な増加(コントロールに対してそれぞれ 21%、10%)を伴い、G0/G1 期の細胞増殖の僅か(3%)ではあるが統計的に有意な減少があった(図 5)。これらのデータは細胞増殖についての先行結果を裏付けており、CRET 処理が細胞周期の進行を促進することを示す。

**図 4. BrdU 免疫蛍光アッセイ。**ビスベンズイミド染色された核を持つ全細胞集団のうち自身の DNA に BrdU を取り込んだ細胞の画分(アレクサレッド)を第 3～5 継代の培養細胞で定量した。(A) 代表的な顕微鏡写真、スケールバー: 100 $\mu$ m (B) コントロールに対する結果(パーセント)。4 回の反復実験の平均 $\pm$  SEM。\*\*\* $p < 0.001$  (スチューデントの t 検定)。



**図 5. 細胞周期のフローサイトメトリー分析。**第 3 および 4 継代の細胞を CRET 処理または疑似曝露時間終了時に収集し、ヨウ化プロピジウムで染色した。(A) 1 回のみの反復実験の

代表的な結果。各グラフは、対応するサンプルから得た 10,000 の事象の分析を示す。(B) 細胞周期の異なる期の細胞画分のヨウ化プロピジウム測定。コントロールに対するパーセント。4回の反復実験の平均±SEM。\* 0.01 ≤ p ≤ 0.05 (スチューデントの t テスト)。

### 増殖細胞核抗原 (PCNA) の発現に対する CRET の影響

誘発された増殖反応の基礎をさらに検討するために、陽性細胞 (PCNA+) の計数およびウエスタンブロット法で増殖細胞核抗原 (PCNA) の発現に対する CRET の潜在的な影響を検討した。電氣的処理はコントロールに対して PCNA+細胞の統計的に有意な増加 (35%) を誘発した (図 6A および 6C)。ローディングコントロールとしての β-アクチンに対して正規化した PCNA の免疫ブロットのデンシトメトリーについては、CRET 処理サンプルでの PCNA の発現が疑似曝露コントロールでの発現より 35%増加したことが示された (p < 0.05; 対応 t 検定、図 6B および 6C)。

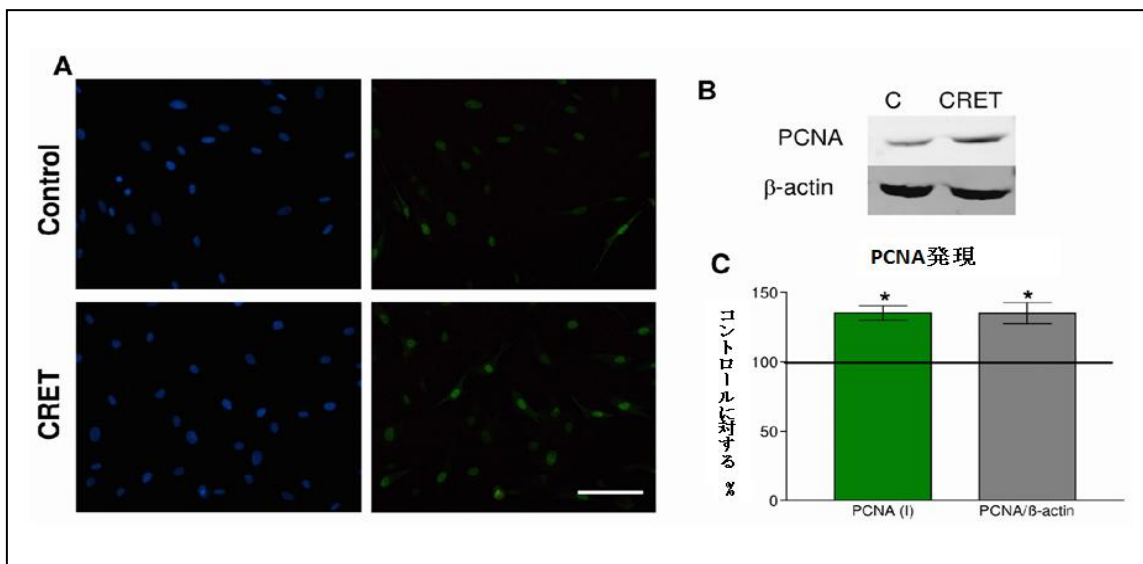
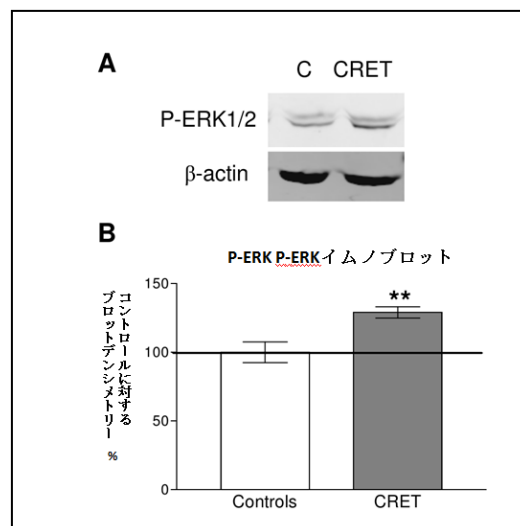


図 6. PCNA の発現。(A)PCNA 抗原の免疫蛍光の顕微鏡画像。PCNA+細胞はアレクサグリーンで見えるようにし、細胞集団全体の核 DNA はビスベンズイミドで青色染色した。スケールバー:100 μm。(B)β-アクチンをローディングコントロールとして使用した PCNA 発現の代表的なブロット (30 μg タンパク質/レーン)。第 3~5 継代の細胞。C: 疑似曝露したコントロール; CRET:通電サンプル。(C)免疫蛍光 (PCNA (I)) および PCNA の免疫ブロットのデンシトメトリー分析 (PCNA/β-アクチン比) の結果。コントロールに対するパーセント。4回の反復実験の平均±SEM (免疫蛍光)、および 5回の反復実験の平均±SD (免疫ブロット)。\*0.01 ≤ p ≤ 0.05 (免疫ブロット分析についての対応 t 検定)。

図 7. p-ERK1/2 の発現。(A)  $\beta$ -アクチンをローディングコントロールとして使用する p-ERK1/2 の発現の代表的なプロット (30  $\mu$ g タンパク質/レーン)。第 3~5 継代の細胞。C: 疑似曝露コントロール。CRET: 処理サンプル。(B) イムノプロットのデンシトメトリー分析。p-ERK1/2/ $\beta$ -アクチン比。コントロールに対するパーセント。3 回の反復実験の平均 $\pm$ SD。



### ERK1/2 シグナル伝達経路に対する CRET の影響

細胞増殖の多様な調節システムの活性は、ERK1/2 の活性化によって調整される[47]。従って、CRET 刺激が ADSC の増殖を促進するため、こうした影響は ERK 伝達経路に対する CRET の作用により媒介された可能性がある。p-ERK1/2 の発現を第 3~4 継代の ADSC のイムノプロット法で評価した。 $\beta$ -アクチンに対し正規化したバンドのデンシトメトリーで、疑似曝露コントロールに対して CRET 処理サンプルにおける p-ERK1/2 発現の 43% の増加が示された ( $p < 0.01$ ; 対応 t 検定、図 7)。

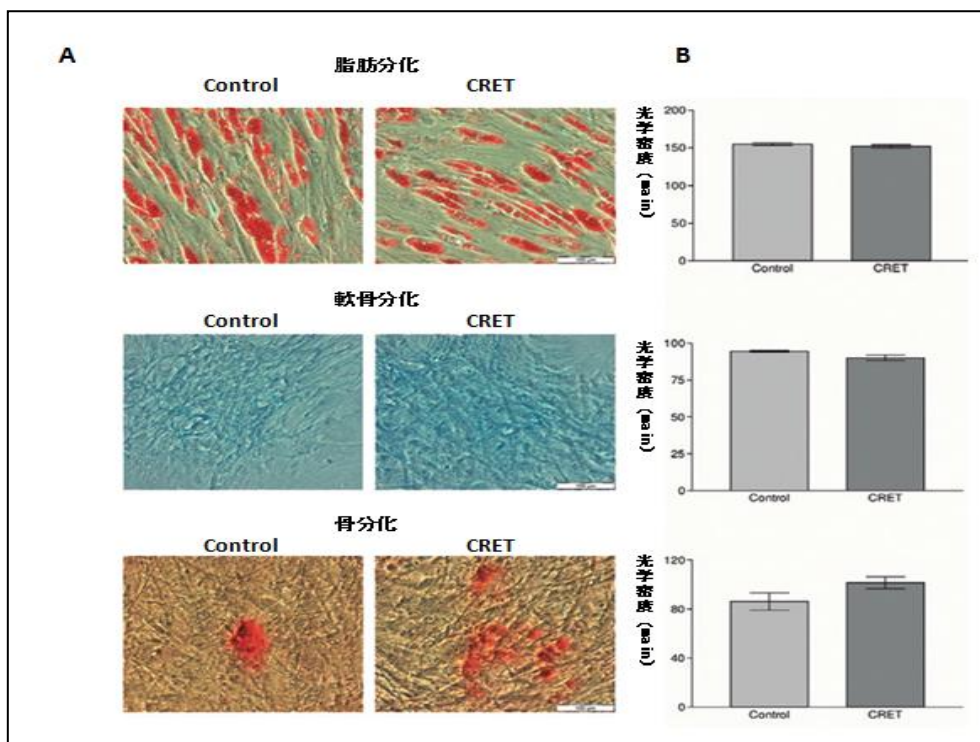


図 8. CRET 処理後の ADSC の多分化能の評価。CRET または疑似曝露後、第 3~4 継代の培養細胞を分化培地の存在下で 14 日間増殖させた。(A) 脂肪生成培地 (上)、軟骨形成培地

(中) または骨形成培地 (下) 中で維持し、それぞれオイルレッド、アルシアンブルー、アリザリンレッドで染色したサンプルの代表的な顕微鏡画像。スケールバー：100 $\mu$ m。(B) ADSC の分化を、顕微鏡像を撮影したサンプルの相対光学密度のコンピュータ支援画像解析による染色定量化によって評価した。ヒストグラムは、CRET 曝露サンプルでの光学密度の平均 $\pm$ SEM が、対応するコントロールでのものと有意な差がなかったことを示している ( $p > 0.05$ )。3 回の反復実験、反復実験につき 4 枚の通電したペトリ皿および 4 枚のコントロールのペトリ皿。

### ADSCはCRET処理後に多分化能を維持

通電処理後の脂肪分化、軟骨分化、骨分化の細胞化学的分析を、ADSCの多能性がCRET曝露によって影響を受けるかどうかを明らかにするために行った。対応する分化培地の存在下での曝露後2週間のインキュベーション後、細胞内脂質小胞、GAG、カルシウムスポットが、それぞれ脂肪生成培養細胞、軟骨形成培養細胞、骨形成培養細胞に存在した。CRET曝露サンプルの分化パターンに、疑似曝露後2週間対応する培地中で維持したコントロールのものとの有意な違いはなかった(図8)。これは、CRET処理が、脂肪分化、軟骨分化、骨分化の能力に関わるADSCの多分化能に影響しないことを示している。

### 考察

物理的刺激への曝露による幹細胞および種々の細胞系統の前駆細胞の増殖促進を目的としたほとんどの研究は、非常に低い周波数の電磁界を使用してきた。例えば、15Hz または 50Hz といった極度に低い周波数 (ELF) のパルス電磁界 (PEMF) への *in vitro* 曝露が、ヒト[48]およびラットの BMSC[49]の細胞増殖をコントロールより 20%から 60%有意に増加させることが示されている。また、0.5~1mT の 50Hz 正弦波フィールドがラットの BMSC の増殖を促進することも報告されている[29,50]。中-高周波スペクトル内の信号周波数を適用する再生治療が近年普及してきたが、こうした周波数の電氣的または電磁的刺激が幹細胞の増殖を促進するという実験的根拠は現時点までに得られていない。本研究の結果は、非温熱量の CRET 高周波電流での刺激の繰り返しが ADSC の増殖を促進し、この効果がリン酸化 ERK1 /2 の発現の刺激により媒介される細胞周期の変化に関わっていることを示している。

ビスベンズイミド標識した核の計数により、中期継代で通電したADSC培養細胞でCRET刺激が細胞数を増加させることが示された。最大の増殖効果には第3~5継代で達し、この際、CRET処理した培養細胞の細胞数が疑似曝露コントロールの数よりも最大25%多かった(図3A)。逆に、電氣的な誘発による細胞数のこうした増加は第3継代以前でも第6継代以降でもみとめられなかった。核計数で得られたこれらの結果はXTTアッセイで確認された(図3B)。

微弱な電氣的または電磁的刺激に対する増殖反応の継代依存性は他の研究者によってもみとめられている。例えば、中期継代で曝露する場合のみ15Hz、7mTのPEMFが骨芽細胞株MC3T3-E1の細胞増殖を刺激することをDiniz et al.[51]が報告した。低密度の播種および週に1継代という本論文に記載した条件下にMesenPro培地中で増殖させた場合、我々のADSCは最初の2週間はCRET刺激に対し感受性でないように見える。この反応の欠如は、初期の継代での未熟細胞に特徴的な非感受性に起因すると思われる。第3～6週/継代からは、疑似曝露培養細胞を週に30～50倍の比率で拡張した際（データは示していない）、細胞は感受性になり、電気刺激に反応してその増殖率が增加する。後期継代で応答がないまたは潜在的に増殖を抑制しさえする反応については（図3）、第7継代からはMesenPro-RSTM中で培養したADSCが複製老化に進むという事実によるとと思われる。実際に、我々の後期継代細胞は、老化培養物の特徴である異数性を含む多数の遺伝子異常を示した（データは示していない）。CRETが老化ADSCで増殖抑制効果を誘発する可能性は、CRET処理が、様々な遺伝子変異があることが知られている[52、53]2種のヒト癌細胞株である肝細胞癌HepG2および神経芽腫NB69で抗増殖効果を引き起こすことを報告している私たちのグループの以前の研究[32-36]で部分的に裏付けられるとみられる。

核DNAへのBrdU取り込みのデータは、中期継代の培養物においてCRET刺激が実際に細胞増殖を疑似曝露コントロールより平均38%増加させることを示した（図4）。この結果は、PCNA発現の免疫細胞化学的およびイムノプロット分析により潜在的に確認される（図6）。PCNAはDNAポリメラーゼ関連核タンパク質であるため、その発現はDNA修復期だけでなく細胞周期のS期およびG2期にも増加する。結果的に、今回の結果で示されるPCNA発現とBrdU取り込みの類似は、現在、DNA複製の適切な指標と解釈されている[46]。あるいは、PCNAレベルの増加がCRET曝露によるDNA損傷を示唆しているかもしれない。しかし、PCNA発現の増加が細胞数の増加を伴うという事実は、BrdU取り込みのデータと共に、CRETにより誘発される増殖効果がS/G2期での細胞周期の進行の促進により媒介される可能性を示している（図5）。

異なる年齢および性別の4名のドナーから採取したADSC培養細胞の反応の比較では、中期継代で通電した際にCRETの増殖効果の有意な違いは示されなかった。また、CRET処理した培養物が脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞を含む様々な種類の細胞に分化する能力を維持する（図8）という事実は、増殖しているADSCの多分化能が電氣的刺激に影響されないことを示唆している。従って、CRET電流の臨床応用について、これらの結果は、電気処置がすでに増殖している幹細胞の増殖を促進することによって損傷の修復を促進または加速する可能性を示唆している。こうした増殖効果は、少なくとも*in vitro*では患者の年齢や性別に依存しないようであり、また、後に多くの細胞系統に分化するADSCの多分化能に影響しないと思われる。

電氣的または電磁的刺激に対する増殖反応が、特殊な増殖周期の細胞の割合の増加と関係している可能性があることを示す根拠が存在する。これについては、50Hz、0.5mTのフィールドが細胞周期のS期およびG2期に進む細胞の割合を増加させることでマウスBMSCの増

殖を誘発することが報告されている[29]。また、ヒトBMSCは、曝露中にG2/M期にある細胞の割合および処理時間終了時にG0/G1期の細胞の割合が増加することにより、15HzのPEMFでの*in vitro*での通電に対する増殖反応を示す[48]。最近では、Li et al.[49]が、50Hz、10mTのPEMFへの曝露がラットBMSCの増殖を増加させ、細胞周期をG1期で停止することを報告した。著者らはこれを刺激の潜在的な細胞分化効果と解釈している。本研究では、フローサイトメトリー分析で、CRET曝露後の培養細胞が、非増殖期のG0/G1期の細胞の割合の限定的ではあるが統計的に有意な低下(図5)を伴う、S、G2、有糸分裂期の細胞の割合の増加を示したことが明らかになった。従って、448kHzのCRET電流での処理により、損傷した組織にある静止状態の幹細胞が刺激されて細胞周期の増殖期に進行し、それにより組織修復につながる幹細胞の再生プロセスを誘発する可能性があるという仮説を立てることができる。

CRETによって誘発される増殖反応の元となる分子機序については、細胞増殖および細胞周期の制御に関わり、また、電気刺激に対して潜在的に影響を受けやすいシグナル伝達経路が主な候補である。これらの経路のうち、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(MAPK-ERK1/2)は、細胞外起源の増殖シグナルの伝達に一般的に関わる分子である。ERKが属するセリン/トレオニンキナーゼファミリーは、多様な化学的[47]および物理的刺激[54-56]により活性化される可能性がある。ERK1およびERK2は、MEK(MAPK/ERKキナーゼ)によるリン酸化により完全に活性化される。静的DC電場が、MAPKシグナル伝達カスケードERK1/2の活性化により水晶体上皮の再生を制御する可能性があることが報告されている[57]。その他の理学療法も、超音波処理したヒト皮膚線維芽細胞で見られるように[58]、ERK1/2の活性化により誘発される細胞増殖を通して損傷の回復を促進する可能性がある。今回の結果は、リン酸化ERK1/2の発現レベルが、疑似曝露したコントロールと比較した際に、CRET処理したADSCで有意に増加したことを示している(図7)。これは、微弱な電氣的または電磁的的刺激がRas/Raf/MEK/ERK経路を活性化するという存在している根拠と一致しており、そして、ヒト間葉系細胞に対するCRETの増殖作用がこうしたシグナル伝達経路の活性化により少なくとも部分的に発揮される可能性があるという仮説に大きな裏付けを与えている。

## 結論

つまり、本論文で報告した結果は、電熱的CRETセラピーで現在使用されている448kHzの電氣的刺激への間欠的な曝露が、健康なヒトドナーから採取した間葉系幹細胞でERK1/2シグナル伝達経路の上方制御を誘発し、増殖を促進することを示している。この電氣的刺激は50  $\mu\text{A}/\text{mm}^2$ という非温熱性の電流密度で適用されたため、これらの結果は、熱以外の分子および細胞機序が組織の修復のためのCRET処置の治療効果にきわめて重要である可能性を明らかにしている。今回の結果は、CRET処理が、損傷領域に存在するADSCの増殖

を活性化することで組織再生を促進する可能性も示唆している。更に、この処理で誘発される増殖反応は、その後の脂肪分化、軟骨分化または骨分化のための幹細胞の多分化能を否定しないと思われる。医療行為に応用可能である場合、これらの結果は、CRETの電氣的治療が、様々な組織の損傷および血管病変の回復に対する有効な補助療法として、またはいくつかの化学療法の副作用に敏感な患者に対する治療の選択肢として適用される可能性を示唆している。また、間葉系幹細胞は損傷領域で抗炎症性インターロイキンを分泌することで炎症プロセスの制御に直接介入するため[2]、間葉系幹細胞の局所的な集団を増加させる能力を通してCRETが抗炎症治療で有用である可能性がある。CRETが結合組織への幹細胞の分化を促進する可能性を検討する研究が進行中である。

## <以下訳省略>

### Acknowledgments

The authors thank Dr. María Antonia Martínez-Pascual for her valuable technical assistance. This work was financially supported by Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Ramón y Cajal, through Project FiBio-HRC No. 2012/0032. The founder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### Disclosure Statement

The authors declare that no competing interest exists.

### References

- 1 Schaffler A, Buchler C: Concise review: Adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 2007;25:818-827.
- 2 Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, Leroux MA: Concise review: Role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl Med* 2012;1:142-149.
- 3 Hronik-Tupaj M, Rice WL, Cronin-Golomb M, Kaplan DL, Georgakoudi I: Osteoblastic differentiation and stress response of human mesenchymal stem cells exposed to alternating current electric fields. *Biomed Eng Online* 2011;10:9.
- 4 Adey WR: Cell membranes: The electromagnetic environment and cancer promotion. *Neurochem Res* 1988;13:671-677.
- 5 Adey WR: Biological effects of electromagnetic fields. *J Cell Biochem* 1993;51:410-416.
- 6 Miyakoshi J: Radiofrequency biology: In vitro; in Kato M (ed) *Electromagnetics in biology*. Japan, Springer, 2006, pp 305-317.
- 7 Messlerli MA, Graham DM: Extracellular electrical fields direct wound healing and regeneration. *Biol Bull* 2011;221:79-92.
- 8 Costin GE, Birlea SA, Norris DA: Trends in wound repair: Cellular and molecular basis of regenerative therapy using electromagnetic fields. *Curr Mol Med* 2012;12:14-26.
- 9 Pilla AA: Nonthermal electromagnetic fields: From first messenger to therapeutic applications. *Electromagn Biol Med* 2013;32:123-136.
- 10 Belenky I, Margulis A, Elman M, Bar-Yosef U, Paun SD: Exploring channeling optimized radiofrequency energy: A review of radiofrequency history and applications in esthetic fields. *Adv Ther* 2012;29:249-266.
- 11 Boyette MY, Herrera-Soto JA: Treatment of delayed and nonunited fractures and osteotomies with pulsed electromagnetic field in children and adolescents. *Orthopedics* 2012;35:e1051-1055.
- 12 Whipple TL: From mini-invasive to non-invasive treatment using monopolar radiofrequency: The next orthopaedic frontier. *Orthop Clin North Am* 2009;40:531-535, x.
- 13 Conner-Kerr T, Isenberg RA: Retrospective analysis of pulsed radiofrequency energy therapy use in the treatment of chronic pressure ulcers. *Adv Skin Wound Care* 2012;25:253-260.



- 14 Lolis MS, Goldberg DJ: Radiofrequency in cosmetic dermatology: A review. *Dermatol Surg* 2012;38:1765- 1776.
- 15 Gardner SE, Frantz RA, Schmidt FL: Effect of electrical stimulation on chronic wound healing: A meta-analysis. *Wound Repair Regen* 1999;7:495-503.1754
- 16 Fredericks DC, Nepola JV, Baker JT, Abbott J, Simon B: Effects of pulsed electromagnetic fields on bone healing in a rabbit tibial osteotomy model. *J Orthop Trauma* 2000;14:93-100.
- 17 Bogie KM, Reger SI, Levine SP, Sahgal V: Electrical stimulation for pressure sore prevention and wound healing. *Assist Technol* 2000;12:50-66.
- 18 Martinez-Rodriguez A, Bello O, Fraiz M, Martinez-Bustelo S: The effect of alternating and biphasic currents on humans' wound healing: A literature review. *Int J Dermatol* 2013;52:1053-1062.
- 19 Ud-Din S, Perry D, Giddings P, Colthurst J, Zaman K, Cotton S, Whiteside S, Morris J, Bayat A: Electrical stimulation increases blood flow and haemoglobin levels in acute cutaneous wounds without affecting wound closure time: Evidenced by non-invasive assessment of temporal biopsy wounds in human volunteers. *Exp Dermatol* 2012;21:758-764.
- 20 Recio AC, Felter CE, Schneider AC, McDonald JW: High-voltage electrical stimulation for the management of stage iii and iv pressure ulcers among adults with spinal cord injury: Demonstration of its utility for recalcitrant wounds below the level of injury. *J Spinal Cord Med* 2012;35:58-63.
- 21 Young S, Hampton S, Tadej M: Study to evaluate the effect of low-intensity pulsed electrical currents on levels of oedema in chronic non-healing wounds. *J Wound Care* 2011;20:368, 370-363.
- 22 Sun S, Titushkin I, Cho M: Regulation of mesenchymal stem cell adhesion and orientation in 3d collagen scaffold by electrical stimulus. *Bioelectrochemistry* 2006;69:133-141.
- 23 Tandon N, Goh B, Marsano A, Chao PH, Montouri-Sorrentino C, Gimble J, Vunjak-Novakovic G: Alignment and elongation of human adipose-derived stem cells in response to direct-current electrical stimulation. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2009;2009:6517-6521.
- 24 Huang L, Cormie P, Messerli MA, Robinson KR: The involvement of Ca<sup>2+</sup> and integrins in directional responses of zebrafish keratocytes to electric fields. *J Cell Physiol* 2009;219:162-172.
- 25 Hammerick KE, Longaker MT, Prinz FB: In vitro effects of direct current electric fields on adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;397:12-17.
- 26 Griffin M, Iqbal SA, Sebastian A, Colthurst J, Bayat A: Degenerate wave and capacitive coupling increase human msc invasion and proliferation while reducing cytotoxicity in an in vitro wound healing model. *PLoS One* 2011;6:e23404.
- 27 Kato S, Saitoh Y, Miwa N: Repressive effects of a capacitive-resistive electric transfer (CRET) hyperthermic apparatus combined with provitamin C on intracellular lipid-droplets formation in adipocytes. *Int J Hyperthermia* 2013;29:30-37.
- 28 Kang KS, Hong JM, Kang JA, Rhie JW, Jeong YH, Cho DW: Regulation of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by controlling electromagnetic field conditions. *Exp Mol Med* 2013;45:e6.
- 29 Zhong C, Zhang X, Xu Z, He R: Effects of low-intensity electromagnetic fields on the proliferation and differentiation of cultured mouse bone marrow stromal cells. *Phys Ther* 2012;92:1208-1219.
- 30 Kloth LC, McCulloch JM: Promotion of wound healing with electrical stimulation. *Adv Wound Care* 1996;9:42-45.
- 31 San BH, Moh SH, Kim KK: Investigation of the heating properties of platinum nanoparticles under a radiofrequency current. *Int J Hyperthermia* 2013;29:99-105.
- 32 Hernandez-Bule ML, Trillo MA, Bazan E, Martinez-Pascual MA, Leal J, Ubeda A: Nonthermal levels of electric currents applied in capacitive electric transfer therapy provokes partial cytotoxic effects in human neuroblastoma cultures. *Neurocirugia (Astur)* 2004;15:366-371; discussion 371.
- 33 Hernandez-Bule ML, Trillo MA, Cid MA, Leal J, Ubeda A: In vitro exposure to 0.57 MHz electric currents exerts cytostatic effects in HepG2 human hepatocarcinoma cells. *Int J Oncol* 2007;30:583-592.
- 34 Hernandez-Bule ML, Cid MA, Trillo MA, Leal J, Ubeda A: Cytostatic response of HepG2 to 0.57 MHz electric currents mediated by changes in cell cycle control proteins. *Int J Oncol* 2010;37:1399-1405.
- 35 Hernandez-Bule ML, Roldan E, Matilla J, Trillo MA, Ubeda A: Radiofrequency currents exert cytotoxic effects in NB69 human neuroblastoma cells but not in peripheral blood mononuclear cells. *Int J Oncol* 2012;41:1251-1259.
- 36 Hernandez-Bule ML, Trillo MA, Ubeda A: Molecular mechanisms underlying antiproliferative and differentiating responses of hepatocarcinoma cells to subthermal electric stimulation. *PLoS One* 2014;9:e84636.
- 37 Ganzit GP, Stefanini L, Stesina G: Nuove methodice nei trattamento della patologia muscolo-articolare dell'atleta: La tercaterapia. *Med Sport* 2000;53:361-367
- 38 Melegati G, Volpi P, Tornese D, Mele G: Rehabilitación en patologías del tendón. *Revista del Deporte, Investigación*

- de traumatología e investigaciones afines 1999;21:66-83.
- 39 Mondardini P, Tanzi R, Verardi L, Briglia S, Maione A, Draco E: Nuove metodologie nel trattamento della patologia muscolare traumatica dell'atleta. *Med Sport* 1999;52:201-213.
- 40 Martínez-Rubio A, Bordas-Serrat JR: Tratamiento del asma mediante transferencia eléctrica capacitiva (TEC). *Rehabil Fis XXI* 1992;3:18-19.
- 41 Calpe J, García C, Hernández R, Gaspar M, Rotellar E: Nuestra experiencia con un recuperador electrónico en lesiones vasculares de pacientes hemodializados. *Rev Soc Esp Dial Trasplant* 1998;19:19-22.
- 42 Takahashi K ST, Onodera M, Hirabayashi S, Tsuzuki N, Zhong-Shi L: Clinical effects of capacitive electric transfer hyperthermia therapy for lumbago. *J Phys Ther Sci* 1999;11
- 43 Takahashi K ST, Onodera M, Hirabayashi S, Tsuzuki N, Zhong-Shi L: Clinical effects of capacitive electric transfer hyperthermia therapy for cervico-omo-brachial pain. *J Phys Ther Sci* 2000;12:43-48.
- 44 Arnedo F, Andrew A, Till L, Sendrós S, Hellín S: Radiofrecuencia monopolar capacitiva/resistiva 448 kHz (indiba activ therapy) en el tratamiento rehabilitador de lesiones de la musculatura isquibial derivada de la práctica deportiva: XIV Congreso Nacional de la Federación Española de Medicina del Deporte. Santander, Spain, 2012, XXIX, pp 915.
- 45 Sust F, Linde X, Sendrós S, Figueras G, Till L: Radiofrecuencia monopolar capacitiva/resistiva 448 kHz (indiba activ therapy) en el tratamiento de lesiones músculo-tendinosas: XIV Congreso Nacional de la Federación Española de Medicina del Deporte. Santander, Spain, 2012, XXIX, pp 915.
- 46 Woods AL, Hall PA, Shepherd NA, Hanby AM, Waseem NH, Lane DP, Levison DA: The assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histological grade, S, G<sub>2</sub> M phase fraction (flow cytometric analysis) and prognosis. *Histopathology* 1991;19:21-27.
- 47 Chambard JC, Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P: Erk implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:1299-1310.
- 48 Sun LY, Hsieh DK, Yu TC, Chiu HT, Lu SF, Luo GH, Kuo TK, Lee OK, Chiou TW: Effect of pulsed electromagnetic field on the proliferation and differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Bioelectromagnetics* 2009;30:251-260.
- 49 Li X, Zhang M, Bai L, Bai W, Xu W, Zhu H: Effects of 50 Hz pulsed electromagnetic fields on the growth and cell cycle arrest of mesenchymal stem cells: An in vitro study. *Electromagn Biol Med* 2012;31:356-364.
- 50 Liu C, Yu J, Yang Y, Tang X, Zhao D, Zhao W, Wu H: Effect of 1 mT sinusoidal electromagnetic fields on proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stromal cells. *Bioelectromagnetics* 2013;34:453-464.
- 51 Diniz P, Shomura K, Soejima K, Ito G: Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. *Bioelectromagnetics* 2002;23:398-405.
- 52 Bouma ME, Rogier E, Verthier N, Labarre C, Feldmann G: Further cellular investigation of the human hepatoblastoma-derived cell line HepG2: Morphology and immunocytochemical studies of hepatic-secreted proteins. *In Vitro Cell Dev Biol* 1989;25:267-275.
- 53 Feder MK, Gilbert F: Clonal evolution in a human neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst* 1983;70:1051-1056.
- 54 Dupont E, Cieniewski-Bernard C, Bastide B, Stevens L: Electrostimulation during hindlimb unloading modulates PI3K-AKT downstream targets without preventing soleus atrophy and restores slow phenotype through erk. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009;300:R408-417.
- 55 Martinez MA, Ubeda A, Cid MA, Trillo MA: The proliferative response of NB69 human neuroblastoma cells to a 50 Hz magnetic field is mediated by ERK1/2 signaling. *Cell Physiol Biochem* 2012;29:675-686.
- 56 Li F, Chen T, Hu S, Lin J, Hu R, Feng H: Superoxide mediates direct current electric field-induced directional migration of glioma cells through the activation of AKT and ERK. *PLoS One* 2013;8:e61195.
- 57 Wang E, Zhao M, Forrester JV, McCaig CD: Electric fields and map kinase signaling can regulate early wound healing in lens epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:244-249.
- 58 Zhou S, Schmelz A, Seufferlein T, Li Y, Zhao J, Bachem MG: Molecular mechanisms of low intensity pulsed ultrasound in human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 2004;279:54463-54469.1755