

令和 2 年 7 月 12 日現在

機関番号：33708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10367

研究課題名(和文) 筋肉に対する放射線影響を解明する

研究課題名(英文) The research for the effects of X-rays irradiation on muscle and muscle precursor cells

研究代表者

櫻井 智徳 (Sakurai, Tomonori)

岐阜医療科学大学・保健科学部・教授

研究者番号：90400142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：筋衛星細胞へのX線照射影響は、静止期において、また、型コラーゲン上で行うことによって、軽減することを見出した。筋衛星細胞の遊走能は、X線4、8 Gyの照射で減少した。速筋と遅筋の比率に対するX線照射影響は、分化誘導前X線照射、分化誘導度X線照射いずれの場合においても、速筋のミオシン重鎖をコードする遺伝子発現が増加し、遅筋のミオシン重鎖をコードする遺伝子発現が減少していた。マイオカイン分泌に対するX線照射影響評価においては、CCL8、CXCL1 CCL2、CCL7、FGF21のmRNA発現量変化がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋肉に対する放射線影響は、筋肉が放射線に強いと考えられてきたことから、影響が全く見られないわけではないにもかかわらず進められた来なかった。本研究では、多くの観点から、また、筋肉に関する研究の最新知見である内分泌機能の観点からも含めて筋肉に対する放射線影響を検討し、影響が現れる条件を明らかにした点で意義深い。

研究成果の概要(英文)：In this research, we investigated the effects of X-rays irradiation on muscle and muscle precursor cells. We found that the irradiation to muscle precursor cells at G1 phase and the cells cultured on collagen type I reduced the effects of irradiation on myogenic differentiation. The migration ability of muscle precursor cells decreased in irradiation at 4 and 8 Gy. The increase in Myh1 and Myh4 mRNA expressions and decrease in Myh7 mRNA expression were detected by X-rays irradiation both after and before myogenic differentiation. It means X-rays irradiation lead to the increase in fast muscle and decrease in slow muscle because Myh4, Myh1 and Myh7 encode the fastest, faster and latest muscle fibers, respectively. X-rays irradiation decreased mRNA expressions of myokines, CCL8, CXCL1 CCL2, CCL7, FGF21.

研究分野：放射線生物学

キーワード：C2C12 筋衛星細胞 マイオカイン 速筋 遅筋 細胞遊走

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 筋肉組織は放射線に対して強い組織であると考えられてきた。「放射線は未熟な細胞に多大な影響及ぼすが、筋肉組織は最終状態まで分化が進行した成熟した細胞で構成されているため、放射線の影響を受けにくい」と考えられてきたからである。しがしながら、前立腺がん、口腔がんに対する放射線治療の実施例が増えてくると、筋肉組織は予想していたよりも放射線に対して弱いことがわかってきた。
- (2) このことに加えて、筋肉に関する研究が進み、筋肉が幹細胞から再生されるシステムは他の臓器が再生されるシステムと異なっていること、老化の原因の一つは形の崩れたタンパク質が筋肉内のミトコンドリアに蓄積すること、今まで甲状腺、副腎、下垂体、膵臓、生殖器系臓器のみと考えられてきた内分泌器官としての役割が筋肉にもあること、加齢性の筋萎縮は筋肉を構成するミオシンのタイプの構成が変化することなど、筋肉が持つ新しい役割が次々と明らかになってきた。筋肉は男性で体重の 40%、女性で 35%を占める器官であり、筋肉への影響は今まで考えられてきたよりも大きいことが認識され始めた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、最近明らかになってきた筋肉の新しい知見も加え、筋肉が実は放射線に強くなかったという現象のメカニズムを明らかにして、放射線治療、放射線防護などの観点から臨床応用するための基盤となる知見を提供することである。具体的には、

- (1) 筋肉幹細胞が放射線照射によって受ける影響を体内での状態に即して明らかにすることである。筋肉幹細胞の細胞周期が静止期にあることの影響、細胞外マトリックスの存在の影響を明らかにする。
- (2) 筋肉の内分泌器官としての機能に対する放射線照射の影響を明らかにすることである。最近の研究によって新たに見出された、この筋肉の機能に対する放射線影響はまだ明らかにされていない。このような筋肉による全身性、局所的な作用は、ある部分で生じた筋肉への放射線照射の影響を、遠くの筋肉、あるいは他の臓器に伝えてしまうかもしれない。本研究では、筋肉から分泌される生理活性物質に対する放射線の影響を評価することによって、今まで考えられてきた通り、放射線照射の影響は放射線照射部位にのみ生じるという考え方が正しいのか、放射線影響は他の臓器に伝わる可能性があるのかを解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 静止期細胞への X 線照射影響評価

マウス由来 C2C12 細胞を、1.5%メチルセルロース添加 10%牛胎仔血清含有 DMEM 培地に分散し、96 ウェル培養プレートに播種した。播種 3 日後、WST-1 assay による細胞代謝確認、播種 24 時間後、BrdU ELISA 法による細胞増殖試験( BrdU 取り込み 24 時間 )によって静止期にあることを確認した。

続いて、24 ウェル培養プレートに、C2C12 細胞を 1.5%メチルセルロース含有培地に分散して播種、24 時間培養後、木沢記念病院の装置を借用し、X 線 2 Gy または 4 Gy (線量率 0.6 Gy/分) 照射した。照射後培養液の牛胎児血清濃度を 2%に下げ、筋衛星細胞を筋芽細胞、筋管細胞へ分化誘導した。分化誘導 3、4、6 日後、筋細胞、筋管細胞を、マウス抗ミオシン抗体を用いた蛍光免疫染色と DAPI を用いた核染色によって染色し、筋管分化への影響を評価した。

### (2) コラーゲンコーティングの影響評価

C2C12 細胞を接着細胞培養用の処理をただけのプレートまたは 型コラーゲンがコーティングさ

れたプレートに播種、24 時間培養後、木沢記念病院の装置を借用し、X 線 2 Gy または 4 Gy (線量率 0.6 Gy/分) 照射した。照射後培養液の牛胎児血清濃度を 2% に下げ、筋衛星細胞を筋芽細胞、筋管細胞へ分化誘導し、そのまま 6 日間分化誘導した。分化によって生じた筋細胞、筋管細胞を、マウス抗ミオシン抗体を用いた蛍光免疫染色と DAPI を用いた核染色によって染色し、筋管分化への影響を評価した。

### (3) 遊走過程に対する X 線照射影響評価

(a) C2C12 細胞に DiIC12(3) を取り込ませた後、ファルコン製フルオロブロックインサート上面に  $5 \times 10^4$  個の細胞を播種し 12 時間培養した。木沢記念病院の X 線照射装置を用いて、2、4 または 8 Gy (線量率 0.7 Gy/分) 照射した。続いてインサート下面を、肝細胞増殖因子 (HGF)、線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2) またはインスリン様増殖因子-1 (IGF-1) を含む培養液に接触させ、遊走性評価実験を開始した。2、4、6、10、24 時間後に蛍光プレートリーダーで蛍光 588 nm の強度を測定した。

(b) C2C12 細胞を培養用プレートに播種し、翌日、木沢記念病院の X 線照射装置を用いて 2、4、8 Gy の X 線を照射した。照射後、培地に HGF、FGF-2、IGF-1 を加え、24 時間培養後、リアルタイム RT-PCR 法によって FGFR、c-Met、CXCR4、Gab1 遺伝子の発現量を半定量的に評価した。

### (4) 速筋・遅筋比率への X 線照射影響評価

(a) C2C12 細胞に X 線 2、4、8 Gy (線量率 0.73 Gy / 分) を照射直後に細胞を筋管細胞へと分化誘導し、分化誘導 5 日目に、リアルタイム RT-PCR 法によって Myh7, Myh2, Myh1, Myh4 遺伝子 (それぞれ I, IIa, IIx, IIb 型筋繊維をコード)、Myf-5, MyoD1, myogenin, Myf-6 (筋衛星細胞が筋管細胞に分化する際に重要な転写因子群) 遺伝子の発現を評価した。

(b) C2C12 細胞を 6 日間筋管細胞へと分化誘導した後 X 線を 2、4、8 Gy 照射し、照射 4 時間後、リアルタイム RT-PCR 法によって Myh7, Myh2, Myh1, Myh4、Myf-5, MyoD1, myogenin, Myf-6 遺伝子の発現を評価した。

(c) C2C12 細胞を 4 日間筋管細胞へと分化誘導した後 X 線を 4 Gy または 10 Gy 照射し、照射 1、3、6 日後、リアルタイム RT-PCR 法によって Myh7, Myh2, Myh1, Myh4、Myf-5 遺伝子の発現を評価した。

### (5) マイオカイン分泌に対する X 線照射影響評価

(a) C2C12 を 6 日間筋管細胞へと分化誘導後、X 線を 2、4、8 Gy 照射し、4 時間無血清培地中で培養した。培養終了直後、リアルタイム RT-PCR 法によって、IL-6、CCL2、CCL5、CCL7、CCL8、CXCR4 遺伝子の発現量を半定量した。

(b) C2C12 を 6 日間筋管細胞へと分化誘導後、X 線を 2、4、8 Gy 照射し、照射後、培養液を TNF-を含む無血清培地に変更し、4 時間培養した。培養終了直後、リアルタイム RT-PCR 法によって、IL-6、CCL2、CCL5、CCL7、CCL8、CXCR4 遺伝子の発現量を半定量した。

(c) C2C12 を 4 日間筋管細胞へと分化誘導後、X 線を 4、10 Gy 照射し、1、3、6 日後にリアルタイム RT-PCR 法によって、CCL2、CCL7、CCL8、FGF21 遺伝子の発現量を半定量した。

## 4. 研究成果

### (1) 静止期細胞への X 線照射影響評価

WST-1 assay、BrdU ELISA 法による細胞増殖試験により、代謝は維持されているが細胞増殖は停止していることを確認した。静止期の筋衛星細胞に X 線を照射した後筋管細胞へと分化誘導した場合の X 線照射による細胞数、ミオシン陽性エリア、細胞融合指数の減少度は、増殖期の筋衛星細胞に X 線を照射した後筋管細胞へと分化誘導した場合と比較して小さくなった。X 線照射によるミオシン陽性エリアの減少が抑制ではなく遅延によって生じている現象には、静止期での X 線照射においても増殖期での X 線照射においても変化がなかった。

## (2) コラーゲンコーティングの影響評価

型コラーゲンをコーティングすることによって、全体細胞数、筋管を形成している細胞数、筋管に分化することで生じるミオシンタンパク質の発現領域に対する X 線照射の影響は軽減した。しかしながら、細胞数全体における筋管を形成している細胞数の割合には変化がなかった。

## (3) 遊走過程に対する X 線照射影響評価

### (a) 遊走細胞数に対する X 線照射影響評価

インサート下面への遊走細胞数は、FGF-2 存在下では、増殖因子非存在下と比較して、放射線照射のない場合で 100%増加、2、4 Gy 照射で 80%増加、8 Gy 照射で 50%増加であった。HGF 存在下では、放射線照射のない場合、2 Gy 照射の場合で 30%増加、4、8 Gy 照射の場合では増殖因子がない場合と明確な差がなかった。IGF-1 では、添加による効果が明確に見られなかった。

各増殖因子において放射線照射がない場合と比較すると、FGF-2 存在下では 4、8 Gy 照射で約 20%減少した。HGF 存在下では 4、8 Gy 照射で約 25%減少した。

### (b) 遺伝子発現に対する X 線照射影響評価

FGF-R、CXCR4、Gab1 の発現量は X 線量の増加に伴い増加した。特に CXCR4 の発現量の増加量が最も著しかった。c-Met、CXCR4、Gab1 の発現量は X 線量が変化しても、有意な差がみられなかった。これらの遺伝子群と遊走能変化との関連性は明確ではなかった。

## (4) 速筋・遅筋比率への X 線照射影響評価

### (a) 分化誘導前 X 線照射の影響

Myh1、Myh4 の mRNA 発現量は線量依存的に有意に増加した。逆に、Myh7 の mRNA 発現量は線量依存的に減少した。筋線維の運動性の速さは、速い順に MHC- (Myh4)、MHC- d/x (Myh1)、MHC- a (Myh2)、MHC- (Myh7) である。分化誘導前の X 線照射で、速筋のミオシン重鎖をコードする遺伝子発現が増加し、遅筋のミオシン重鎖をコードする遺伝子発現が減少していた。

一方、Myf-5、MyoD1 の mRNA 発現量が線量依存的に増加し、Myf-6、myogenin の mRNA 発現量は線量依存的に減少した。Myh1、Myh2、Myh4、Myh7 それぞれの発現量と、Myf-5、MyoD1、myogenin、Myf-6 それぞれの発現量との相関を検討したところ、Myh1、Myh2、Myh4、Myh7 の発現量と、Myf-5、MyoD1、myogenin、Myf-6 の発現量との相関性は、Myh1 は Myf-5、MyoD1 と正の相関、Myf-6 と負の相関がみられ、Myh4 は Myf-5、MyoD1 と正の相関、myogenin、Myf-6 と負の相関、Myh7 は Myf-5 と負の相関、Myf-6 と正の相関があった。Myf-5、MyoD1、myogenin、Myf-6 は、筋衛星細胞から筋管細胞が形成されるときに発現が高度に制御され、それぞれが分化誘導の中で重要な役割を持つ転写因子群である。活性化された筋衛星細胞で Myf-5 が発現し、分化が誘導されると、Myf-5 の発現が減少しながら MyoD1、続いて myogenin の発現が増加してくる。分化がさらに進むと、Myf-6 の発現が検出

できる。このため、今回の結果から、X線による筋管形成の遅延が、速筋・遅筋発現の違いによって表れている可能性が示唆されていると考えられる。

#### (b) 分化誘導後 X線照射の影響

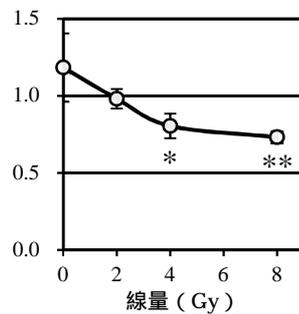
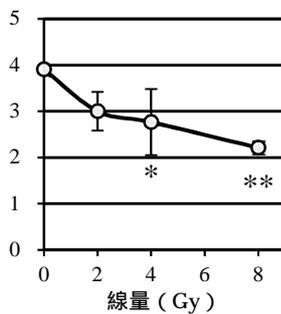
分化誘導後に X線照射し、4 時間後に遺伝子発現解析した場合には、X線照射による影響は認められなかった。

分化誘導後に X線照射し、経時的に 6 日まで遺伝子発現解析した場合には、最も速く収縮する b 型筋線維を制御している Myh4 では遺伝子発現量の上昇が見られ、次に収縮の速い x 型筋線維を制御している Myh1 では、照射直後減少したのち発現量が増加した。Myh2 の変化は軽微だが、最も収縮の遅い型筋線維をコードしている Myh7 では、照射直後増加したのち発現量が減少した。X線照射によって速筋の形成が促進され遅筋の形成が減少しているか、または X線照射によって遅筋が速筋に変換しやすいことを示していると思われる。

#### (5) マイオカイン分泌に対する X線照射影響評価

##### (a) X線照射 4 時間後の影響

X線照射により、TNF- 刺激による CCL8、CXCL1 mRNA 発現量が減少した。CCL8 の mRNA 発現量減少に関しては、TNF- 刺激のない場合の構造的な mRNA 発現でもみられており、X線照射によりさらなる減少が見られていることから、構造的な発現と TNF- 刺激時の発現両方で障害が生じていると考えられる。



X線照射による CCL8 の mRNA 発現量の変化 (左 : TNF- 刺激あり、右 : TNF- 刺激なし、\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ )

##### (b) X線照射後最大 3 日までの影響

X線照射によって、CCL2、CCL7、CCL8、FGF21 の遺伝子発現量は、いずれも線量依存的に発現量が減少した。CCL2 は一過性の発現上昇であったため、3 日目では X線照射の影響が明確だったが、6 日目では X線照射しない場合大きな差がなくなっていた。CCL7 では、日数の経過に伴い X線照射の影響が明確になった。CCL8 では、10 Gy では 3 日目で明確な X線照射の影響が見られたが、4 Gy では 6 日目に明確な X線照射の影響が見られた。FGF21 では、3 日目以降、明確に線量依存的な放射線影響が見られた。FGF21 は、骨格筋から分泌され、インスリンの刺激で分泌が促進されること、分泌により糖代謝が制御されることが報告されている代謝制御因子であり、X線照射により糖代謝制御が悪化する可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 櫻井智徳、北畑智貴、高木佑莉、櫻井優紀子
2. 発表標題 X線照射によるミオシン重鎖タイプの変化
3. 学会等名 第57回生物部会・第48回制癌シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻井智徳、福山誠介
2. 発表標題 筋肉の内分泌機能に対する放射線の影響
3. 学会等名 日本放射線影響学会第61回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomonori Sakurai, Noriyuki Hirota
2. 発表標題 The effects of strong static magnetic fields on mammalian cells
3. 学会等名 7th International Workshop on Materials Analysis and Processing in Magnetic Fields (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 櫻井智徳
2. 発表標題 専門技師受験のための放射線生物学
3. 学会等名 第36回日本核医学技術学会総会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 櫻井智徳、唐澤玲子、長元志高、廣田憲之
2. 発表標題 培養細胞に見られる強定常磁場の作用
3. 学会等名 磁気科学会 有機・バイオ分科会研究会（招待講演）
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----