

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：35308
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22500491
 研究課題名（和文） 培養筋芽細胞を用いたストレッチの最適有効量の決定と効果発現機序の解明
 研究課題名（英文） The determination of optimal effective amount of the stretching in the cultured myoblast and elucidation of the mechanism of effects
 研究代表者
 元田 弘敏（MOTODA HIROTOSHI）
 吉備国際大学・保健医療福祉学部・講師
 研究者番号：30278999

研究成果の概要（和文）：培養筋芽細胞（H9c2 細胞株、C2C12 細胞株）に機械的に 15 分間の比較的短い伸展刺激を行い増殖と分化への影響を調べた。また、MyoD ファミリー（MyoD, Myogenin, Myf5, MRF4）の RNA の発現量を RT-PCR 法で Myogenin タンパク質と Myosin タンパク質の発現量を Western Blotting 法を用いて検討した。その結果、ストレッチ刺激が骨格筋再生過程における筋芽細胞の増殖には悪影響を及ぼさず、分化に好影響を及ぼすことが明らかとなった。これには MyoD RNA、Myogenin RNA、Myf5 RNA と Myogenin タンパク質、Myosin タンパク質の発現が重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We performed 15-minute relatively short extension stimulation in cultured myoblast (H9c2 cell strain, C2C12 cell strain) mechanically and checked the influence of proliferation and differentiation. In addition, we assayed the expression of the RNAs of MyoD family (MyoD, Myogenin, Myf5, MRF4) with the RT-PCR and Myogenin protein and Myosin protein expression with the Western Blotting method. As a result, stretch stimulation did not adversely affect the proliferation in the skeletal muscle reproduction process, and exerting a positive effect on differentiation was revealed. It was suggested that MyoD RNA, Myogenin RNA and Myf5 RNA and Myogenin protein and Myosin protein played an important role for this.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：リハビリテーション、ストレッチ

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は筋基底膜の内側に存在する筋衛星細胞が損傷部位に集積し、筋芽細胞、筋管細胞、筋線維と分化が進むことで再生するといわれている。また骨格筋の分化に重要な働

きをしている遺伝子として筋特異的分化調整因子の MyoD ファミリー（MyoD, Myogenin, Myf5, MRF4）が知られている。近年、伸展刺激が細胞の分化に及ぼす影響についての分子生物学的な研究が散見される

ようになった。ラット骨格筋細胞 L6 に磁性微粒子を導入し、磁場発生装置で細胞に伸展刺激をかける方法で恒常的に 15 日以上伸展刺激をかけ続けたり、培養 5 日目の筋管細胞の筋線維の長軸方向に頻度 1/6Hz、伸展率 10% の周期的伸張刺激を 72 時間加えた研究などが報告されている。

しかし、臨床で理学療法士が行うストレッチや ROM-ex は比較的短時間で行われている。理学療法で用いられる程度のストレッチや ROM-ex を想定した伸展刺激が細胞レベルでどのような影響を及ぼすかを明確に検討した研究は我々が知る限りではない。また骨格筋の再生過程において、筋芽細胞では増殖と並行して筋管細胞への分化が起こっていると推察されるが、そのような状態を仮定した上で行われた研究も我々が知る限りではない。

2. 研究の目的

本研究の目的はラット由来の培養筋芽細胞に比較的短時間の機械的ストレッチ刺激を加え、それが筋の成熟にどのような影響を及ぼすかを分子生物学的手法で解明することである。

3. 研究の方法

(1) 実験に用いた細胞

①H9c2 細胞株

米国細胞バンク ATCC (America Tissue Type Collection) において登録番号 CRL-1446、細胞名 H9c2 (2-1) で登録されていたものを用いて実験を行った。H9c2 (2-1) 細胞株は Kimura が胎児の BD1X ラットの心臓組織から得た最初のクローンの細胞株からサブクローンされたものである。H9c2 (2-1) 細胞は骨格筋様に分化することが知られている (図 1)。

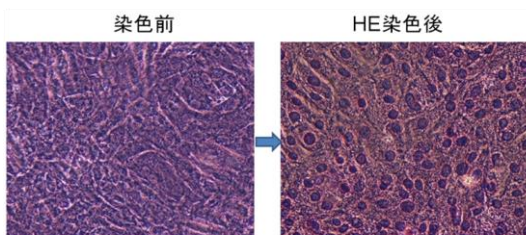


図1 HE染色前・後の細胞核の様子: HE染色前後にH9c2細胞株の観察を行った。HE染色後の方が核をより明瞭に観察できた。

②C2C12 細胞株

米国細胞バンク ATCC (America Tissue Type Collection) において登録番号 CRL-1772TM、細胞名 C2C12 で登録されていたものを購入した。この細胞はマウス骨格筋由来筋芽細胞株で単核の細胞同士が融合することで多核の筋管細胞に分化することができる接着細胞である (図 2)。

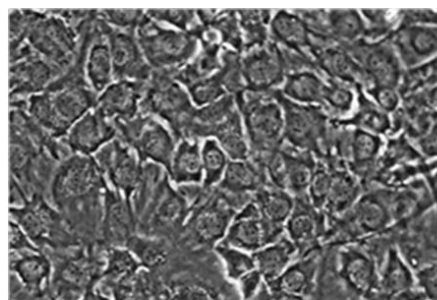


図2 マウス骨格筋由来C2C12筋芽細胞株:単核の接着細胞である。

(2) 機械的伸展刺激

伸縮可能なシリコン製のチャンバーの底面をコラーゲン膜でコーティングし、細胞が約 70% confluence (培養細胞が接着面に対し約 70% 密集して広がった状態) で伸展率を 4%、刺激の頻度を 6 往復/分、刺激時間 15 分で培養細胞伸展装置 (スカラテック, NS-550, 大阪) を用いて伸展刺激を行った。

(3) RT-PCR 法

①total RNA の抽出と cDNA 合成

total RNA は 0 時間 (ストレッチ刺激直後)、4 時間、8 時間、12 時間後に抽出し、RNA 抽出キット NucleoSpin RNA II (MACHEREY-NAGEL, Germany) を用い、方法はそのマニュアルに従った。cDNA 合成は cDNA 合成キット First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Biosciences, UK) を用い、マニュアルに従って、5 μ g の total RNA を計 33 μ l の反応系 (Bulk first-strand reaction mix 11 μ l, oligo (dT) 18 primer 1 μ l, DDT solution 1 μ l, RNA 20 μ l) で 37°C で 1 時間逆転写酵素反応させ cDNA を合成した。

②プライマーの設計

MyoD ファミリー (MyoD, Myogenin, Myf5, MRF4) および GAPDH の 5 種類の mRNA に対してプライマー設計ソフト DART

(<http://tabacum.agr.nagoya-u.ac.jp/dart/>) および amplify

(<http://engels.genetics.wisc.edu/amplify/>) を用いた (表 1)。

表1 MyoDファミリーおよびGAPDHに対するプライマーのシーケンス

Primer	Accession no	Corr.bp	Fragment Size(bp)	Sequence
MyoD	M84176	236-252	617	1)GGGACACAGACTTGCTA
		836-852		2)GCCGTGTAATCCATCA
Myogenin	AF054	111-127	548	1)GACCCAGCTCAGCTTAA
		642-658		2)CATCTGGGAAGGTGACA
Myf5	NM_001106783	270-288	375	1)ACTTCTATGACGGCTCCTG
		626-644		2)TCAGCAGCTCCTGAAGACT
MRF4	M27151	208-226	423	1)ACAGCAGTGGAGAGGAACA
		613-630		2)CCCTGGAATGATCCGAAA
GAPDH	X02231	244-263	323	1)TCAAGGCTGAGAATGGGAAG
		547-566		2)GTTGTCATGATGACCTTGG

③PCR 反応

PCR 反応は TaKaRa LA Taq (Takara, Japan) で行い、計 $10\mu\text{l}$ の反応系で、鋳型 (テンプレート) として上記の cDNA 溶液を $0.5\mu\text{l}$ 使用した。反応としては 94°C イニシャルデナチュレーション 30 秒後、 94°C デナチュレーション、 53°C アニーリング各々 30 秒、 72°C イクステンション 40 秒を MyoD には 28 サイクル行い、Myogenin, Myf5 には 33 サイクル行った。GAPDH は 94°C イニシャルデナチュレーション 30 秒後に 94°C デナチュレーション、 54°C アニーリング、 72°C イクステンション各々 30 秒を 28 サイクル行った。反応終了後、2.0%アガロースゲルの各レーンに反応液 $10\mu\text{l}$ を注入し電気泳動を行った。泳動終了後ゲルを臭化エチジウムで染色し UV トランスイルミネーターで紫外線照射中に写真撮影した。

(4) Western Blotting 法

① 全タンパク質の回収条件

各群においてストレッチ刺激後および対応するコントロール群において 0 時間 (ストレッチ刺激直後)、12 時間、24 時間、48 時間後に各チャンバーから全タンパク質を RIPA Buffer で回収した。

② 電気泳動 (SDS-PAGE) と転写

アトー株式会社より発行されている ATTO Instruction Manual を参考に、7.5%と 10%の分離ゲル濃度のポリアクリルアミドゲルを作成した。各レーンにタンパク質量 $25\cdot\text{g}$ をアプライ後、電圧を 250V、40mA に設定し 60 分間電気泳動を行った。終了後に iBlotTM (Invitrogen, Carlsbad) を用いて invitogen より発行されているマニュアルを参考に、PVDF 膜に転写し、WesternBreeze Chromogenic Immunodetection Protocol に従い検出された Myogenin タンパク質と Myosin タンパク質の染色を行った。

③ 抗原抗体反応

1 次抗体に mouse anti- Myogenin antibody (SANTA CRUZ, California) と mouse anti-Myosin antibody (SANTA CRUZ, California) をどちらも 50 倍希釈で使用した。2 次抗体にどちらもアルカリフォスファターゼが結合した goat anti-mouse IgG (Invitrogen, Carlsbad) を使用した。

④ バンドの検出

アルカリフォスファターゼに反応する Chromogenic Substrate (色素原基質) (Invitrogen, Carlsbad) で染色し、デジタルカメラで撮影した。

(5) 免疫染色法

①細胞の固定

ストレッチ刺激群とコントロール群において 24 時間後に 4%パラホルムアルデヒドで 10 分間細胞を固定した。

② 細胞の浸透化とブロッキング

0.5% Triton X-100 で 5 分間、細胞の浸透化を行った。次に 3% BSA (bovine serum albumin) で 30 分間ブロッキングした。

③ 抗原抗体反応

1 次抗体に mouse anti- Myogenin antibody (SANTA CRUZ, California) と mouse anti-Myosin antibody (SANTA CRUZ, California) をどちらも 50 倍希釈で使用した。2 次抗体にどちらも Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (Invitrogen, Carlsbad) を 250 倍希釈で使用した。

④ 蛍光細胞の検出

Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (蛍光) は蛍光顕微鏡 (Olympus, Tokyo) のフィルター B で検出 (緑色) した。また、全細胞を PI (Propidium iodide) 染色し、フィルター G で検出 (赤色) した。

(6) 筋芽細胞、筋管細胞の観察

①培養、観察の条件

Serum1%で培養した約 70% confluence の細胞を対照群と伸展群に分け、細胞の形質変化を位相差顕微鏡下で観察した。

②細胞の核数 (増殖率) と核融合率の観察及び計測

対照群と伸展群に分けて行った。各培養プレートに 5ヶ所マーキングを施し、生きた細胞の形質的变化を経時的 (伸展刺激直後、1, 2, 3 日後) に位相差顕微鏡下 (200 倍) で観察、写真撮影した。筋芽細胞の増殖 (分裂) の指標として細胞核の増殖率 (伸展刺激後各日の細胞核の数 / 伸展刺激前の細胞核の数 $\times 100$ (%)) を算定した。筋芽細胞から筋管細胞への分化の指標として核の融合率 (筋管細胞に取り込まれた核の数 / 総核数 $\times 100$ (%)) を算定した。また 0 日、3 日後の各群 3 枚のプレートをアルコールで固定後にヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い、同様に観察した (図 1)。

5. 統計学的処理

統計学的処理としては T 検定を用い、有意水準を 5%未満で検出した。

4. 研究成果

(1) mRNA 発現量の伸展刺激後の経時的変化

内部標準に用いた GAPDH の発現量は、伸展刺激直後 (コントロール)、4 時間後、8 時間後、12 時間後において同等の発現量が認められた。一般に GAPDH は条件に依存せずに一定の割合で発現していると考えられている。MyoD の発現量は伸展刺激直後 (コントロール) に対し 4 時間後、8 時間後に増加が認められた。Myogenin の発現量は伸展直後に対し 4 時間後、8 時間後、12 時間後に増加が認められ、Myf5 についても同様の傾向が認められた (図 3)。MRF4 の発現はいずれの時間においても認められなかった (データ非提示)。

これらの結果は MyoD は伸展後初期に筋芽

細胞から筋管細胞への分化に関わり、Myogenin, Myf5 は筋管細胞への分化に長期的に関わっていることを示唆している。

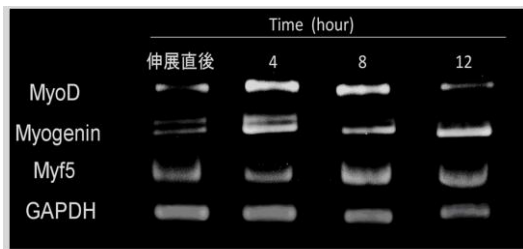


図3 MyoD, Myogenin, Myf5, MRF4のmRNA発現量の経時的変化: MyoD, Myogenin, Myf5, MRF4およびGAPDHのmRNAの伸展刺激直後, 4時間後, 8時間後, 12時間後の発現量の経時的変化を表す。

(2) Myogenin タンパクの発現量の変化

コントロール群に関しては0時間, 12時間, 24時間, 48時間後に経時的に増加が見られた。それに対して伸展刺激群では刺激 24 時間後に発現量はピークを示し、コントロール群よりピークに達するまでの時間が早まった(図4)。

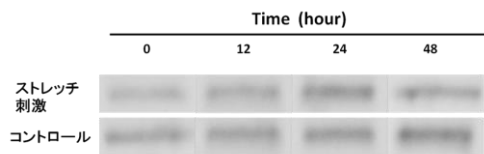


図4 Myogeninタンパク質の発現量の変化: ストレッチ刺激群、コントロール群共に、0時間、12時間、24時間、48時間のMyogeninタンパク質の発現量の変化を現している。

また、Myosin タンパクの発現量の変化に関して、コントロール群、伸展刺激群の両群ともに 12 時間後に減少し、24 時間後に増加のピークが認められた。その際 (24 時間後)、コントロール群に比較し伸展刺激群は優位な増加が見られた(図5)。

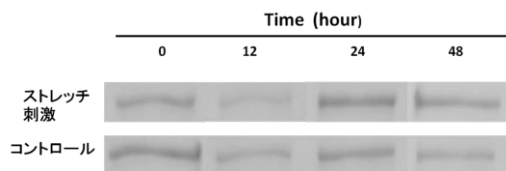


図5 Myosinタンパク質の発現量の変化: ストレッチ刺激群、コントロール群共に、0時間、12時間、24時間、48時間のMyosinタンパク質の発現量の変化を現している。

一般に Myogenin タンパク質は筋管細胞の分化に、Myosin タンパク質は骨格筋の収縮に必須のタンパク質と言われている。そのため本実験のストレッチ刺激は Myogenin タンパ

ク質の発現を誘導し細胞分化に好影響を与え、その結果として Myosin タンパク質の増加が観察されたことが示唆された。

(3) 免疫染色

Myogenin の免疫染色に関してはコントロール群と伸展刺激群ともに細胞周期依存的に細胞核での発現が認められた。陽性細胞の割合や発現量に明らかな差は認められなかった(図6)。Myosin の免疫染色に関してはコントロール群と伸展刺激群ともに Myosin タンパク質は検出不能であった(データ不記載)。

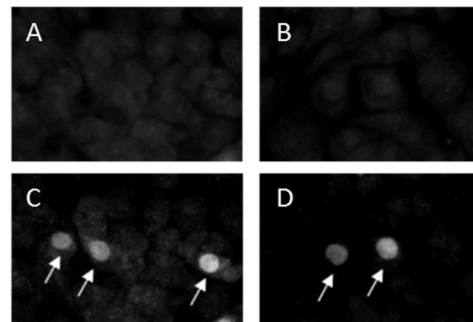


図6 Myogeninタンパク質の免疫染色: AとCはストレッチ刺激後で、BとDはストレッチ刺激前を表しておりAとC、BとDはそれぞれ同一視野である。AとBはPI染色を、蛍光顕微鏡のフィルターGで検出した(赤色)。CとDはMyogeninタンパク質の発現を蛍光顕微鏡のフィルターBで検出した(緑色)。矢印で示したのが発現したMyogeninタンパク質である。

Western Blotting 法で示したように、Myogenin タンパク質はコントロール群でも一定量の発現が認められたので免疫染色法での識別は困難であったと考えられるが、どちらの群でも細胞周期依存的に細胞核に発現することが確認できた。

(4) 細胞の増殖率変化

細胞は伸展刺激前で約 70% confluence, 伸展刺激 3 日後で約 100% confluence となった。増殖率は対照群、伸展群ともに時間依存的に同様の増加傾向を示し、伸展刺激 1 日後, 2 日後, 3 日後のいずれにおいても有意差は認められなかった(図7)。HE 染色後においても同様の傾向が認められた(データ非提示)。

細胞の増殖(分裂)は両群ともに同様の増加傾向を示したことから、本実験での筋芽細胞に対する伸展刺激は増殖に悪影響を及ぼさないことが示唆された。

(5) 伸展刺激後の細胞核の融合率変化

伸展刺激前の核の融合率は、対照群で 17.7%、伸展群で 18.8% となった。伸展前、伸展刺激 1 日後では対照群、伸展群間に有意差は認められなかった。伸展刺激 1 日後の核の融合率は対照群で 17.2%、伸展群で 24.0%

となった。伸展刺激 2 日後の核の融合率は対照群で 21.9%，伸展群で 32.3%となった。伸展刺激 3 日後の核の融合率は対照群で 25.4%，伸展群で 48.4%となった。すなわち、伸展刺激 2 日後では伸展群の核融合率は対照群と比べ 10.4% ($p < 0.05$)，刺激 3 日後で 23.0% ($p < 0.01$) 増加した (図 8)。

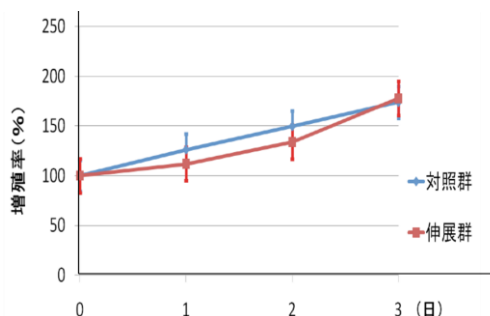


図7 伸展刺激後の細胞核の増殖率変化：縦軸が増殖率、横軸が15分伸展刺激からの経過日数を表している。

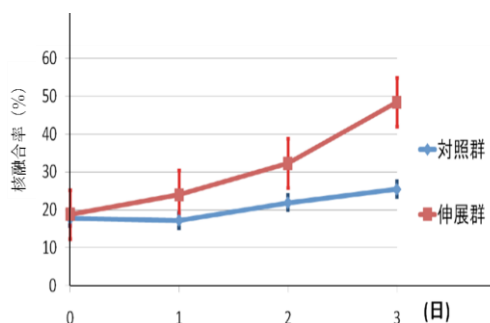


図8 伸展刺激後の細胞核の融合率変化：縦軸が融合率、横軸が15分伸展刺激からの経過日数を表す。

伸展刺激 2 日後、3 日後の核融合率において伸展群は対照群に比べ有意な増加を示したことから、本実験での筋芽細胞に対する伸展刺激は分化に好影響を及ぼすことが示唆された。

以上のこと (結果(1)～(5)) から、臨床で用いられる程度のストレッチ、ROM-ex を想定した機械的伸展刺激は、筋芽細胞の増殖には悪影響を及ぼさず、分化には好影響を及ぼすことが明らかとなった。これには RNA では MyoD, Myogenin, Myf5 が重要な役割を果たし、タンパク質では Myogenin, Myosin が重要な役割を果たしていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 元田弘敏、下田健朗、須山竜司、加納良男、井上茂樹、平上二九三、機械的伸展刺激が筋芽細胞の増殖と分化に及ぼす影響、吉備国際大学保健福祉研究所研究紀要、査読無、13 巻、2012、37-40
- ② 元田弘敏、井上茂樹、加納良男、平上二九三、ストレッチ刺激による筋芽細胞株の分化への影響—Myogenin および Myosin タンパク質発現の解析—、吉備国際大学保健福祉研究所研究紀要、査読無、14 巻、2013、41-44

[学会発表] (計 4 件)

- ① 中川昌幸、橋本直樹、元田弘敏、井上茂樹、平上二九三、伸展刺激が培養細胞に及ぼす影響—MyoD, Myogenin の発現パターンの解析—、第 45 回日本理学療法学会大会、長良川国際会議場(岐阜市)、2010 年 5 月 27 日
- ② 須山竜二、下田健朗、元田弘敏、平上二九三、伸展刺激が筋芽細胞の分化に及ぼす影響、第 46 回日本理学療法学会大会、シーガイアコンベンションセンター(宮崎市)、2011 年 5 月 27 日
- ③ 元田弘敏、平上二九三、培養筋芽細胞を用いたストレッチの最適有効量の決定と効果発現機序の解明、吉備国際大学共同研究報告会、2012 年 2 月 10 日、吉備国際大学
- ④ 元田弘敏、平上二九三、培養筋芽細胞を用いたストレッチの最適有効量の決定と効果発現機序の解明、吉備国際大学共同研究報告会、2013 年 2 月 12 日、吉備国際大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

元田 弘敏 (MOTODA HIROTOSHI)
吉備国際大学・保健医療福祉学部・講師
研究者番号：30278999

(2) 研究分担者

平上 二九三 (HIRAGAMI FUKUMI)
吉備国際大学・保健医療福祉学部・教授
研究者番号：60278976