

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号 : 14401

研究種目 : 挑戦的萌芽研究

研究期間 : 2011 ~ 2012

課題番号 : 23650405

研究課題名(和文) 大気圧プラズマ照射による骨格筋培養細胞の活性化と個体への応用

研究課題名(英文) Skeletal muscle cell activation by atmospheric plasma exposure and application to tissues

研究代表者

中井 直也 (NAKAI NAOYA)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号 : 90324508

研究成果の概要(和文) : 大気圧プラズマ照射が筋芽由来の培養細胞であるC2C12細胞の増殖および分化に及ぼす影響について検討した。大気圧放電プラズマは、アルミ製円筒電極に2.45 GHzのマイクロ波を加え、円筒内にアルゴンガスを流して発生させた。C2C12細胞に大気圧プラズマを1日1回1分間照射すると、1日後および2日後の細胞増殖は有意に低下し、コントロール細胞の50%以下となった。一方、分化誘導培地で培養中のC2C12細胞に3日間にわたって大気圧プラズマを1日1回1分間照射しても、細胞分化の指標となるMyogeninおよびミオシン重鎖の発現量にはプラズマ照射の影響は認められなかった。細胞ストレスの指標となるExtracellular-regulated kinase (ERK) およびc-jun N-terminal kinase (JNK) のリン酸化をWestern blot法で解析したところ、プラズマ照射30分後にはERKおよびJNKのリン酸化は高まったが、照射4時間後には大きく減弱し、それぞれコントロール群の14%と23%となり、24時間後にはコントロールレベルまで回復した。さらに、フローサイトメトリーによって細胞周期を解析したところ、プラズマ照射8時間後の細胞では、G0/G1およびS期の細胞の割合が有意に低下し、G2/M期の細胞の割合が有意に上昇した。以上の結果より、1日1回1分間の大気圧マイクロ波放電プラズマ照射は、C2C12細胞の分化には影響しないが、その増殖を強く抑制することが明らかとなった。その原因として、プラズマ照射はERKおよびJNKのリン酸化を一時的に高めるが、その後リン酸化レベルを低下させることによって細胞周期に影響を及ぼし、特に細胞の分裂を阻害することが示唆された。

研究成果の概要(英文) : Plasma in electrical discharge is a partially ionized gas, containing radicals, electrons, positive and negative ions, and various excited atoms. Recently, many types of low-temperature atmospheric plasma devices have been developed for medical applications. In the present study, we investigate the effect of low-temperature atmospheric plasma exposure on proliferation and differentiation of C2C12 myoblast. The low-temperature atmospheric pressure gas-plasma was generated through an electrical discharge in an argon gas. One min of plasma exposure every 24 h inhibited the cell proliferation without cell death. Cell numbers in plasma exposure groups were 42.2% and 32.9% when compared to the control groups at 24 h and 48 h after the plasma exposure, respectively. On the other hand, the marker proteins for the myoblast differentiation, such as myogenin and myosin heavy chain expressions were not affected by plasma exposure. Plasma exposure increased the phosphorylation of extracellular-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) at 30 min after the exposure. However, phosphorylation of ERK and JNK was markedly decreased less than control levels at 1 and 4 h after the plasma exposure, respectively, and returned to the control levels at 24 h. By flow cytometric analysis, it revealed that plasma exposure increased the % of the cell in the G2/M phase at 8 h after the exposure. It was found that down-regulation of cdc2/cyclin B1, which regulates G2/M checkpoint in plasma-exposed cells. The expression of p21 Waf-1/Cip-1, which was known to control the entry of cells at the G2/M phase transition checkpoint was also elevated in plasma-exposed cells. In conclusion, low-temperature atmospheric plasma exposure retarded

proliferation of C2C12 myoblast by G2/M arrest. Down-regulation of ERK and JNK activity and modulation of cell cycle checkpoint proteins may be involved in plasma exposure-induced cell cycle arrest.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：スポーツ生化学

1. 研究開始当初の背景

プラズマは、熱・光・高反応性化学種などを容易に生成できることや電磁場により制御が可能なことから、これらの機能性を利用した研究や産業への応用が活発に行われている。これまでは、電気、化学、材料などの産業分野ですでに欠くことのできない技術となっていたが、最近では、大気圧下での低温プラズマ流を生成する研究が進み、バイオ・医療分野での利用も始まっている。医療分野では、マイクロ波放電プラズマを利用した医療器具や設備の滅菌が行われ、感染防止に役立てられている。近年では、医療目的で生体や細胞に直接プラズマを照射する研究も行われている。

プラズマは種々の活性種（イオン、電子、活性酸素、ラジカル等）を含んでいる。これらは、生体組織や細胞に化学的作用を及ぼすことによって、細胞増殖やアポトーシスを誘導することが報告されている。しかしながら、その詳細なメカニズムについては十分には明らかにはなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、培養骨格筋細胞に対するプラズマ照射の影響を検討することを目的とする。骨格筋は皮膚の直下に位置していることから医療目的としてのプラズマ照射の対象として応用できる可能性がある。そこで、骨格筋に類似の特性を持つ筋芽由来の培養細胞である C2C12 細胞を対象とし、本研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) C2C12 細胞の培養

実験対象には、筋芽由来の培養細胞である C2C12 細胞を用いた。C2C12 細胞は CO₂ インキュベーター内で、4 ウェルディッシュ (1.9

cm²/well) 上で 0.5 ml の培養液中で培養した。増殖用培地には 10% ウシ胎児血清および抗生物質を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いた。分化誘導用の培地には、2% 仔ウシ血清および抗生物質を含む DMEM を用いた。分化誘導培地は 24 時間ごとに交換した。

(2) 大気圧低温プラズマの照射条件

大気圧低温プラズマは、マイクロ波放電により発生させた。プラズマ発生用のトーチは、ステンレス鋼の電極をアルミニウムの円筒内に設置したものを利用した。マイクロ波電源装置から 2.45 GHz の周波数でトーチ内に出力した。発生電力は 3.5 W で行った。プラズマの発生ガスとしてアルゴンを 1 L/min でトーチ内に流した。マイクロ波放電により発生したアルゴンプラズマの先端から培養液表面までの距離は約 7 mm に設定し、照射を行った。培養液中の細胞に対して、10 秒ずつ 6 カ所 (計 1 分間) にプラズマを照射した (図 1)。

(3) 細胞増殖の分析

細胞増殖はトリパンブルー染色を行い、細胞数を計測することにより解析した。すなわち、コントロール細胞およびプラズマ照射細胞を 0.25% トリプシン-EDTA 溶液で回収し、0.2% トリパンブルーで染色後、血球計算板を用いて顕微鏡下で細胞数を計測した。トリパンブルーで染色されない細胞を生存細胞とした。

(4) ウェスタンブロッティング

目的タンパク質の発現量は等量の細胞総タンパク質を SDS-PAGE により分画後、PVDF 膜に転写し、特異的抗体を用いたウェスタンブロッティング法で解析した。

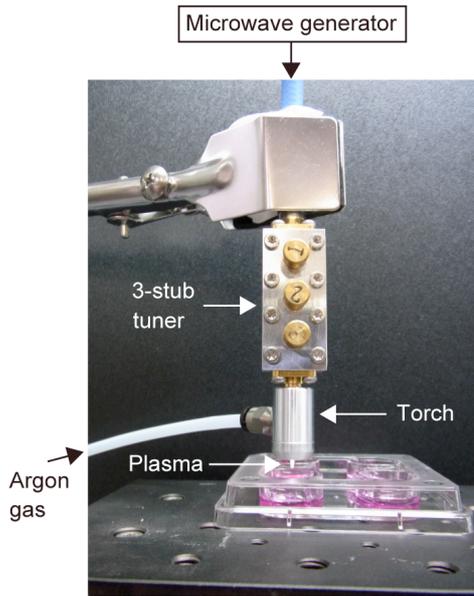


図1. プラズマ発生機器と照射の様子

(5) 細胞周期解析

細胞周期解析は、Cell cycle phase determination kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI)で行った。すなわち、細胞をトリプシン-EDTA 溶液で回収後、固定および浸透化処理を行い、ヨウ化プロピジウム (PI) で DNA の染色を行った。染色後の細胞をフローサイトメーター (FACS Cantoll Flow Cytometer, BD Biosciences, San Jose, CA) で解析した。

(6) 統計処理

データは平均±標準偏差で示した。一元配置および二元配置の分散分析後、各群間の差の検定は Scheffe テストで行った。コントロールとプラズマ群の二群間の有意差検定は対応のない T-test で行った。P<0.05 を有意とした。

4. 研究成果

(1) 細胞増殖に対するプラズマ照射の影響

24 時間毎の 1 分間のプラズマ照射は、細胞死を誘導することなく細胞の増殖を抑制した。トリパンブルーで染色される死細胞数は細胞 100 個あたり 0~2 個であり、コントロール群とプラズマ照射群間に有意差はなかった。プラズマ照射群のウェル当たりの細胞数は、プラズマ照射 1 日後ではコントロール群の 42.2%であり、2 日後では 32.9%であった (図 2A)。一方、ウェル当たりのタンパク量は、プラズマ照射 2 日後では、コントロール群に対してプラズマ照射群で有意に低値を

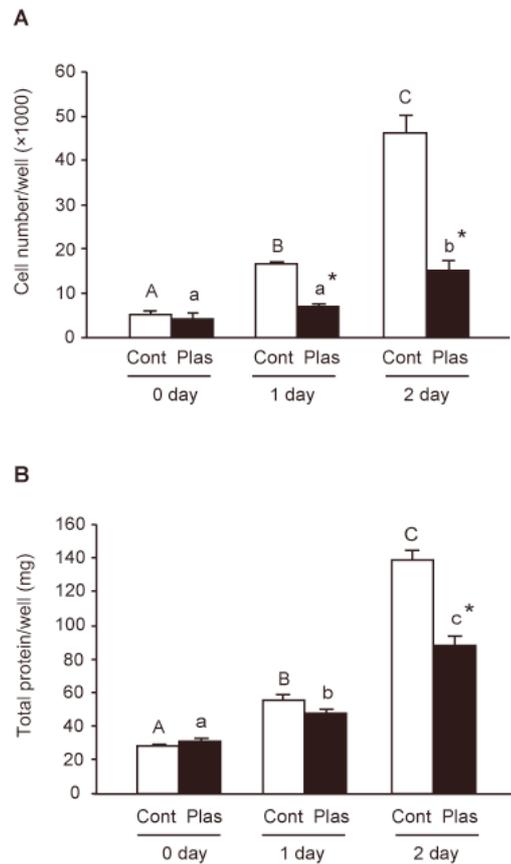


図2. プラズマ照射が細胞増殖 (A) およびタンパク質量 (B) に及ぼす影響 Plas; plasma-exposed cells. *Significantly different from control (Cont) cells in same day. Values with different letters are significantly different (P<0.05).

認めた (図 2B)。以上の結果は、プラズマ照射は C2C12 細胞の増殖を抑制することを示している。また、細胞数とタンパク質量との関係から、プラズマ照射群では細胞一個あたりのタンパク質量がコントロール群より高いことが示唆された。

(2) 細胞分化に対するプラズマ照射の影響

C2C12 細胞は、分化誘導培地で培養すると細胞増殖が抑制されるとともに細胞の融合が促進され、多核の筋管細胞に分化する。そこで、プラズマ照射が C2C12 細胞の分化に及ぼす影響を検討した。その結果、C2C12 細胞の分化マーカーである Myogenin および Myosin heavy chain の発現量にはプラズマ照射の影響は認められなかった。すなわち、プラズマ照射は C2C12 細胞の分化には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

(3) ERK および JNK のリン酸化に対するプラズマ照射の影響

プラズマ照射が細胞増殖抑制に及ぼす影響のメカニズムを明らかにするため、外部からの刺激に反応し、細胞内情報伝達に関わる extracellular-regulated kinase (ERK) (図 3A) および c-Jun N-terminal kinase (JNK) (図 3B) のリン酸化の変動を経時的に解析した。その結果、1 分間のプラズマ照射 30 分後には ERK および JNK のリン酸化が上昇した。しかしながら、ERK のリン酸化は照射 1 時間後にはコントロール細胞のレベルよりも低下した。JNK のリン酸化についても照射 4 時間後でコントロールレベル以下となった。照射 24 時間後には、ERK と JNK のリン酸化レベルはコントロールの値まで回復した。これらの結果は、プラズマ照射直後には、ERK および JNK のリン酸化は一時的に上昇するが、その後長時間にわたって低下するため、プラズマ照射の主たる効果は抑制であることを示唆している。

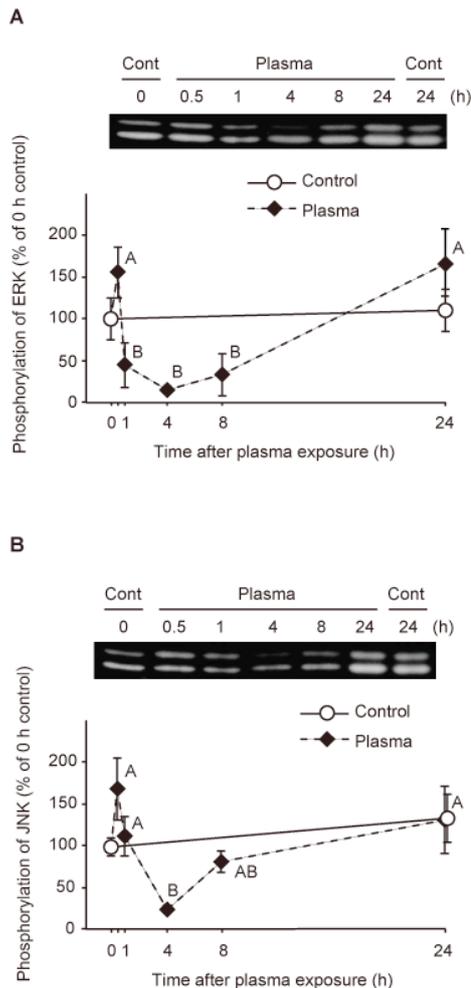


図 3. プラズマ照射による ERK (A) および JNK (B) のリン酸化の経時的変化
Values with different letters are significantly different ($P<0.05$).

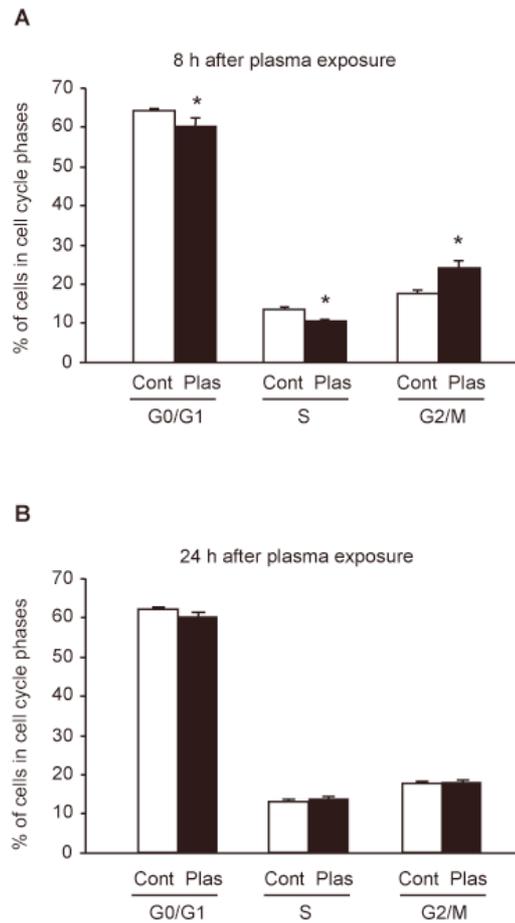


図 4. プラズマ照射 8 時間後 (A) および 24 時間後 (B) の各細胞周期の細胞数の割合
Plas; plasma exposed cells. *Significantly different from Cont (control) group ($P<0.05$).

(4) 細胞周期に対するプラズマ照射の影響

細胞周期は染色された DNA 量を測定するフローサイトメトリー法で解析した。1 分間のプラズマ照射は、照射 8 時間後には G0/G1 期および S 期の細胞の割合を有意に低下させ、G2/M 期の細胞の割合を増加させた (図 4A)。一方、照射 24 時間後には、各細胞周期の比率はコントロール群とは差が認められなかった (図 4B)。これらの結果は、プラズマ照射は一時的に G2/M 期で細胞周期を停止させることを示唆している。プラズマ照射による G2/M 期細胞の増加をさらに詳細に検討するため、細胞周期チェックポイントに関わる制御タンパク質の発現を解析した。その結果、G2/M 期の移行に必要な cyclin B1 の発現は上昇していたが (図 5B)、不活性型であるリン酸化 cdc2 の発現もプラズマ群で上昇していた (図 5A)。このことは細胞分裂に関わる

cdc2/cyclin B1 complex の活性が低下していることを示唆している。さらに、G1 期から G2 期への細胞周期の進行を抑制する p21 Waf-1/Cip-1 の発現も上昇していた (図 5C)。これらの結果は、フローサイトメトリーで得られたプラズマ照射による細胞周期抑制を支持している。

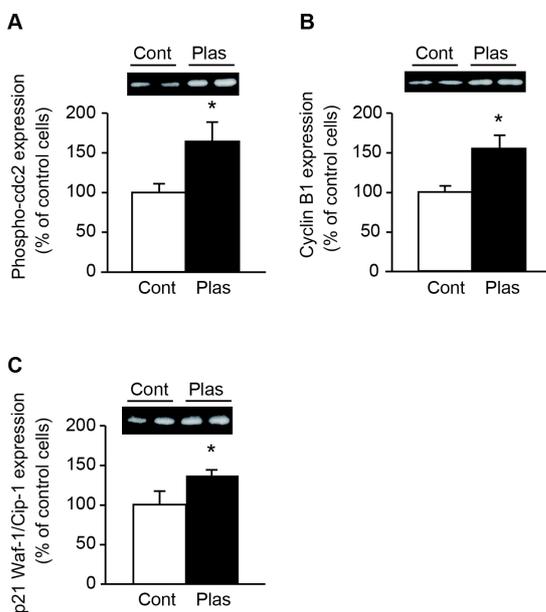


図 5. プラズマ照射が細胞周期チェックポイント制御タンパク質に及ぼす影響
Plas; plasma exposed cells. *Significantly different from Cont (control) group (P<0.05).

本研究の結果より、1 日 1 回 1 分間の大気圧マイクロ波放電プラズマ照射は、C2C12 細胞の分化には影響しないが、その増殖を強く抑制することが明らかとなった。その原因として、プラズマ照射は ERK および JNK のリン酸化を一時的に高めるが、その後リン酸化レベルを低下させることによって細胞周期に影響を及ぼし、特に細胞の分裂を阻害す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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Naoya Nakai, Fuminori Kawano, Yoshinobu Ohira, Retardation of cell proliferation by low-temperature atmospheric plasma exposure on C2C12 myoblast, Experimental

Biology 2013, 2013 年 4 月 23 日、Boston, USA.

- ② 中井直也、河野史倫、大平充宣、大気圧放電プラズマ照射が骨格筋培養細胞に及ぼす影響、日本体力医学会大会、2012 年 9 月 14 日、岐阜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中井 直也 (NAKAI NAOYA)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：90324508

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

高橋 和生 (TAKAHASHI KAZUO)
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授
研究者番号：50335189