

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 21 日現在

機関番号：33708

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591839

研究課題名(和文)放射線による筋管細胞形成障害の分子メカニズムの解明と防護方法の研究

研究課題名(英文)The research for the mechanisms and protection method of radiation-induced suppression of myotube formation

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：筋芽細胞から筋管が形成される過程が放射線照射によって阻害される原因の解明、筋管形成の阻害に対する効果的な防護方法の確立に関し研究した。遺伝子発現解析の結果、筋管形成に関わる転写因子の発現減少が放射線照射によって筋管形成が阻害される原因であること、X線照射時の筋芽細胞の増殖性、細胞周期分布が放射線影響に大きくかかわっていること、既に見出しているインスリン様増殖因子以外にも繊維芽細胞増殖因子、肝細胞増殖因子を、濃度、作用時間を制御しながら用いることで効果的に防護できる可能性があることを見出した。

研究成果の概要(英文)：I investigated the mechanisms and the protection methods of X-ray-induced delay of myotube formation. I evaluated the alterations of gene expressions of four key transcription factors and demonstrated the decrease in myogenin gene expression related to the X-ray-induced decrease in myotube formation. I also find that the cell cycle distributions and cell growth state of C2C12 cells affected the effects of X-ray irradiation on myotube formation. In addition, I showed that fibroblast growth factor and/or hepatocyte growth factor had the ability to protect the X-ray-induced decrease in myotube formation if these growth factors appropriately used in the point of concentration and/or time point, and so on.

研究分野：放射線生物学

キーワード：筋芽細胞 筋管形成 筋管形成阻害 増殖因子 IGF-1 FGF-2 HGF C2C12

1. 研究開始当初の背景

(1) 筋肉は神経に続いて放射線抵抗性であると考えられているが、放射線治療分野では放射線による筋肉萎縮の副作用が報告されている。

(2) 筋肉の再生は生体内で比較的高頻度で生じている現象なので、筋肉自体への影響よりも、筋肉の再生過程、筋芽細胞から筋管が形成される過程に対して放射線が影響していると仮定した。筋芽細胞から筋管が形成される過程が放射線によって遅延されることは既報があり、我々の研究室でも既に確認していた。我々の研究室ではさらに検討を進めて、インスリン様増殖因子を分化誘導過程に作用させることで、筋管形成への放射線照射の影響が軽減できることを見出していた。

(3) しかしながら、インスリン様増殖因子は悪性化した腫瘍で発現していることもあり、腫瘍との関連性が示唆される問題点がある。また、放射線によって筋芽細胞からの筋管形成が阻害されるメカニズム、阻害される際の鍵となる遺伝子変化に関して十分な情報が得られていない。

2. 研究の目的

(1) 放射線によってどのようなメカニズムで筋管形成が阻害されているのかを検討する。放射線照射によって筋芽細胞から筋管細胞が形成される筋肉再生現象を滞らせる影響が出ることは確認できていたが、どのような遺伝子が関連するかに関する研究は進んでいなかった。また、未熟な細胞が成熟した細胞よりも放射線感受性が高いこと、細胞増殖の激しい細胞の方が、細胞増殖の緩慢な細胞よりも放射線感受性が高いことは経験的に導き出されているが(ベルゴニー・トリボンドーの法則)、遺伝子変化レベルでの具体的なメカニズムは明らかになっていない。このような点を今回の研究で明らかにすることで、将来的には、幹細胞、組織幹細胞、がん幹細胞、芽細胞といった未熟な細胞の放射線応答メカニズムの違いの本質を明らかにすることに繋がることが期待できる。

(2) がんの種類、がんの進行度によっては、放射線による筋管形成阻害の防護として、インスリン様増殖因子が使用できない可能性も生じてしまう。この課題解決に対するアプローチとして、他の増殖因子による防護効果を検討する。他の増殖因子を検討し、その結果をインスリン用増殖因子の結果と比較、精査することで、インスリン様増殖因子の特徴、作用メカニズムも明らかになることが期待できる。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現への影響：マウス由来筋芽細胞 C2C12 を 4.0×10^4 個/cm² で播種、牛胎児

血清 10%を含む DMEM 培地中で 24 時間培養後、線量率 1 グレイ/分で X 線 2、4 グレイを照射した。照射直後、培地を、牛胎児血清 2%を含む DMEM 培地に変更することで筋管細胞に分化誘導した。このとき、インスリン様増殖因子を 50 ng/mL 添加または添加しない状態で分化誘導を行った。分化誘導 1、2、7 日後、細胞から RNeasy Mini キットを用いて RNA を抽出後、PrimerScript RT キットを用いて相補的 DNA を合成し、サイバークリーン I 法を用いたリアルタイム PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) を行うことによって、細胞中に発現しているメッセンジャー RNA 量を半定量した。本研究では、筋管分化過程で重要な役割を果たしている 4 つの転写因子 (MyoD1, Myf-5, myogenin, Myf-6) の発現を評価した。

(2) 照射前の遺伝子発現状況の違いと放射線影響の違いの相関：照射前の遺伝子発現状況の違いは、ATCC から購入した C2C12 細胞と大日本製薬から購入した C2C12 細胞を用意することで行った。購入先の異なる C2C12 細胞をそれぞれ 4.0×10^4 個/cm² で播種、牛胎児血清 10%を含む DMEM 培地中で 24 時間培養後、RNeasy Mini キットを用いて RNA を抽出後、PrimerScript RT キットを用いて相補的 DNA を合成し、サイバークリーン I 法を用いたリアルタイム PCR を行うことによって、細胞中に発現している Pax7、CD34、Pitx2、MyoD1、Myf5、myogenin 遺伝子の発現を評価した。標準化遺伝子には HPRT-1 を用いた。放射線影響の違いは、それぞれの細胞を住友ベークライト製 24 ウェル型・セルディクスに 4.0×10^4 個/cm² で播種、牛胎児血清 10%を含む DMEM 培地中で 24 時間培養後、線量率 1 グレイ/分で X 線 2、4 グレイを照射した。照射直後、培地を、牛胎児血清 2%を含む DMEM 培地に変更し、6 日間培養を継続、筋管組織に分化誘導した。分化誘導後、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、筋組織に分化した細胞を同定した。続いて、CCD カメラによって蛍光免疫染色画像を取得し、ImageJ を用いて、取得した画像中の、抗ミオシン抗体陽性部分の面積を算出した。また、 $146 \mu\text{m} \times 109 \mu\text{m}$ 視野中の総核数を算出した。

(3) 線維芽細胞増殖因子、肝細胞増殖因子による放射線防護の評価：C2C12 細胞を住友ベークライト製 24 ウェル型・セルディクスに 4.0×10^4 個/cm² で播種、牛胎児血清 10%を含む DMEM 培地中で 24 時間培養後、線量率 1 グレイ/分で X 線 2、4 グレイを照射した。照射直後、培地を、牛胎児血清 2%を含む DMEM 培地に変更し、6 日間培養を継続、筋管組織に分化誘導した。その際に、線維芽細胞増殖因子または肝細胞増殖因子を存在さ

せて筋管細胞を形成させた。筋管細胞形成の度合いは、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評価した。蛍光免疫染色の結果は、ImageJ を用いて、細胞数、抗ミオシン抗体陽性面積、Fusion Index (筋管細胞中の細胞核 / 全細胞数) について定量した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子発現への影響：インスリン様増殖因子が添加されていない状態での X 線照射による遺伝子発現への影響は、以下のとおりである。MyoD1 については、1 日目は線量依存的な変化は見られず、2、7 日目は線量増加により発現量が増加した。Myf-5 については、1、2、7 日目ともに線量増加による明確な傾向はなかった。Myogenin については、1 日目は線量依存的な変化は見られないが、2、7 日目は線量増加により発現量が減少した。Myf-6 については、7 日目には線量依存的な変化は見られないが、1、2 日目は線量増加により発現量が減少した。一方、インスリン様増殖因子が分化誘導中に存在する場合としない場合での遺伝子発現の違いは、以下のとおりである。MyoD1、Myf5 については、インスリン様増殖因子を添加したことによる遺伝子発現状況には明確な傾向がみられなかった。Myogenin については、1 日目の発現量にはインスリン様増殖因子を添加したことによる明確な変化の傾向がみられないが、2 日目には、インスリン様増殖因子の添加により発現量が減少する傾向がみられ、7 日目には、添加により遺伝子発現量の増加傾向が確認できた。Myf-6 については、1、2 日目は添加による発現量変化に明確な傾向を見出すことは困難であったが、7 日目には、添加によって発現量が増加することが確認できた。転写因子の発現を時間、空間的に制御することで筋肉形成が制御されていると考えられ、筋芽細胞から筋管が形成される過程で細胞は分化していくが、分化状態によって発現している転写因子が異なる。Myf-5 は最も早期に、myogenin は幹細胞が筋肉に分化することが運命づけられると、Myf-6 は筋肉形成の後期に発現する転写因子である。今回の結果では Myf-5 の発現量には X 線の線量もインスリン様増殖因子の添加も明確な傾向のある影響を及ぼさなかったため、非常に早期の細胞の運命決定は最終的な放射線影響、その防護には関係していないと考えられる。一方、myogenin は筋管形成との関連が強いと、放射線影響、その防護の状況と良く対応した。興味深いのは、myogenin 発現量とインスリン様増殖因子の添加の有無の関係が 2 日目と 7 日目とで入れ替わっていることである。インスリン様増殖因子は筋芽細胞の増殖と分化の両方を促進できる増殖因子であるが、2 日目では筋肉への運命決定を遅らせているように働いている。この時期は放射線によって有効に分化できる細胞の数は

減少しており、増殖を優先させ、分化に移る細胞を抑制していると考えられる。その後、あるタイミングで分化促進が優勢になることで、放射線に対する防護を行っていると考えられる。

(2) 照射前の遺伝子発現状況の違いと放射線影響の違いの相関：ATCC 提供の C2C12 は、X 線を 2、4 グレイ照射しても抗ミオシン抗体陽性部分の面積、細胞核数ともに変化が見られなかった。一方、大日本製薬提供の C2C12 では、X 線照射によって、抗ミオシン抗体陽性部分の面積、細胞核数の明らかな減少が見られた。遺伝子発現の解析結果から、大日本製薬提供の C2C12 と比較して、ATCC 提供の C2C12 では、Pax7 の発現量が増加しており、myogenin 発現量が減少していた。Pax7 は未分化な筋芽細胞のマーカー遺伝子であり、myogenin は筋細胞に特異的に発現する遺伝子である。従って、ATCC 提供の C2C12 の方が大日本製薬提供の C2C12 より未分化状態であるといえる。より未分化な C2C12 の方が、放射線感受性が低く、ベルゴニー・トリボンドーの法則と矛盾する結果であったので、ATCC 提供の C2C12 と大日本製薬提供の C2C12 の細胞増殖、細胞周期分布を評価したところ、ATCC 提供の C2C12 の方が、増殖性が低く、G2 期細胞の割合も低かった。このことから、細胞の増殖性、放射線感受性の細胞周期に分布する細胞数が放射線感受性に非常に影響を及ぼしていることが明らかになった。

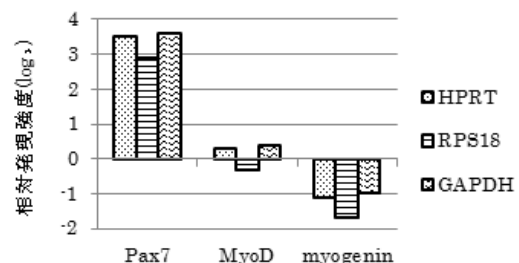


図 1 ATCC 提供の C2C12 細胞の照射前の遺伝子発現状況。大日本製薬提供の C2C12 細胞に対する比で示した

(3) 線維芽細胞増殖因子、肝細胞増殖因子による放射線防護の評価：増殖因子を添加しない場合、線量を増加させると細胞数、Fusion Index 共に減少した。このことから、X 線による筋管形成の減少には、細胞数の減少、生存した細胞の融合の減少の両方が関与していることがわかった。線維芽細胞増殖因子は、高濃度では X 線量が増加しても細胞数が増加しているが、抗ミオシン抗体陽性面積は激減しており、高濃度の線維芽細胞増殖因子は筋管形成に不利なことがわかる。一方肝細胞増殖因子は、2 グレイ照射時、細胞数、抗ミオシン抗体陽性面積、Fusion Index とともに増加が認められた。4 グレイ照射時では、添加に

よる増加は認められなかった。線維芽細胞増

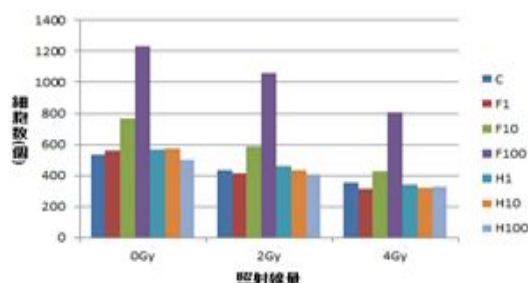


図 2 線維芽細胞増殖因子と肝細胞増殖因子の細胞数変化に対する影響。C は増殖因子添加なし、F1、F10、F100 はそれぞれ線維芽細胞増殖因子 1、10、100 ng/mL 存在させたときの結果、H1、H10、H100 はそれぞれ肝細胞増殖因子 1、10、100 ng/mL 存在させたときの結果

殖因子と肝細胞増殖因子を共存させた結果からは、線維芽細胞増殖因子 100 ng/mL で 3 日間処理後、肝細胞増殖因子 10 ng/mL で 3 日間処理した実験群の効果が最も高い可能性が示唆され、増殖因子の適切な組合せ、適切な時期での使用は検討の余地があることと考えられた。

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)

櫻井 智徳、橋本 歩、清川 倫子、菊池 一貴、宮越 順二、Myotube orientation using static magnetic fields、Bioelectromagnetics、査読有、33 巻、2012、pp. 421-427

DOI : 10.1002/bem.21701

櫻井 智徳、成田 英二郎、篠原 直毅、宮越 順二、Alterations gene expression by exposure to a magnetic field at 23 kHz is not detected in astroglia cells、Journal of Radiation Research、査読有、54 巻、2013、pp. 1105-1109

DOI : 10.1093/jrr/rrt063

[学会発表](計 8 件)

櫻井 智徳、強定常磁場の細胞影響について、日本磁気学会第 21 回強磁場応用専門研究会、2012 年 9 月 21 日、大阪大学

櫻井 智徳、廣田 憲之、Strong static magnetic fields induced orientation of myotube differentiated from myoblast、3rd International Colloquium on Electric and Magnetic Fields at Extremely Low Frequency (EMF-ELF 2013)、2013 年 10 月 15 日、奈良県新公会堂

櫻井 智徳、廣田 憲之、Strong static magnetic fields alignment of myotubes、International Conference on Magneto-Science、2013 年 10 月 15 日、フ

ランスボルドー

櫻井 智徳、新田 宗之、尾関 亨斗、Y 線誘発筋管形成阻害に対する増殖因子の影響、第 56 回放射線影響学会大会、2013 年 10 月 19 日、ホテルクラウンパレス青森

櫻井 智徳、長元 志高、中原 佑介、廣田 憲之、The effects of static magnetic fields on cell migration、6th International Workshop on Materials Analysis and Processing in Magnetic Fields、2014 年 7 月 8 日~7 月 11 日、沖縄県糸満市

櫻井 智徳、三浦 沙也佳、放射線誘発筋管形成阻害における遺伝子発現変化、第 57 回放射線影響学会大会、2014 年 10 月 1 日~10 月 3 日、鹿児島県鹿児島市かごしま県民交流センター

櫻井 智徳、長元 志高、廣田 憲之、細胞浸潤に対する強定常磁場の影響、第 9 回日本磁気科学会、2014 年 11 月 13 日~11 月 14 日、岐阜県高山市高山市民文化会館

櫻井 智徳、三浦 沙也佳、Gene expression analysis of radiation-induced delay of myotube formation、15th International Congress of Radiation Research、2015 年 5 月 25 日~5 月 29 日、京都府京都市国立京都国際会館

[図書](計 1 件)

櫻井 智徳 他、Nova Biomedical Press、Cellular Response to Physical Stress and Therapeutic Applications、2013 年、37 頁-53 頁

6. 研究組織

(1) 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