様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ４ 月 １５ 日現在

機関番号：１２３０１
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2011～2013
課題番号：２３５９２１５６

研究課題名（和文）マウス筋原細胞の筋分化に及ぼす群生効果の解析

研究課題名（英文）Community effect on muscle differentiation of C2C12 cells

研究代表者
渡辺　秀臣（WATANABE, HIDEOMI）

群馬大学・保健学研究科・教授

研究者番号：４０２３１７２４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,900,000円、（間接経費）　　1,170,000円

研究成果の概要（和文）：C2C12筋原細胞の筋分化における群生効果を確認するために異なった細胞密度で培養して、細胞濃度が高い程筋分化が促進されること、筋分化マーカーのMyoDとmyogenin、殖抑制因子CDKIp21の発現が増加することを確認した。筋分化には細胞増殖と接触増殖抑制が必要である事が示唆された。また、臨床的に筋力増強が股関節装具の機能的運動能力改善に重要である事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To examine the community effect on C2C12 myogenesis growth kinetics and myogenic differentiation were investigated in cells plated at different cell densities. Expression of a myogenic differentiation marker was found to be high in a density-dependent manner. When cell-cell contact was obvious in high-density plating, contact-inhibition was found after the proliferation stage This was accompanied by up-regulation of negative regulating cell cycle markers including CDKIp21 and muscle differentiation markers MyoD and myogenin. Drebrin protein expression was also up-regulated. Thus contact-inhibition may induce growth arrest via cell-cell communication through the expression of CDKI p21 and may be responsible for progressing cell fusion, i.e., cell differentiation to myocyte.
In the clinical settings, muscle strength augmentation due to daily exercise may provide an essential effect of a hip brace on functional mobility performance in patients with hip osteoarthritis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：筋分化　C2C12　細胞密度　群生効果　接触抑制　リハビリテーション　筋力増強

１．研究開始当初の背景

筋原細胞はトレーニングによって活性化されて増殖し、筋に分化し、そして筋線維に融合することにより筋線維の肥大に重要な働きをする [Allen RE, et al. Methods Cell Biol, 52, 155-176, 1998]。スポーツやリハビリテーションに有効な筋力増強効果をもたらすトレーニングを開発するためには、細胞レベルでの筋細胞の分化や増殖の機序を明らかにすることは重要な課題である。

筋原細胞の研究は、人や動物から直接採取する satellite cells で行われてきたが、採取された細胞の均一性や持続性から、再現性を保つことが困難である[Allen RE, et al. Methods Cell Biol, 52, 155-176, 1998]。このために、培養維持が容易で、国際的にも汎用されているマウス筋原細胞 C2C12 が筋原細胞の増殖や分化に用いられている。C2C12 細胞は、1977 年に Yaffe と Saxel によりマウスの筋肉から分離確立され、未分化の状態で長期維持が可能であり、American Type Culture Collection(ATCC) より入手可能で、研究の再現性の高い細胞である[Yaffe D, Saxel O. Nature, 270, 725-727, 1977]。細胞の筋線維への分化は confluent state になった状態で培養液から血清濃度を落とすことにより誘導され、多細胞が融合した多核の筋線維の出現と筋細胞特異蛋白 Myosin heavy chain(MHC)の発現が確認される[Yaffe D, Saxel O. Nature, 270, 725-727, 1977]。C2C12 筋原細胞を用いた研究は広い範囲におよび、その増殖、分化、運動等が明らかになった[Carlo AD, et al. J. Biol. Chem., 279, 16332-16338, 2004]。私たちも、低酸素の効果について既に報告している[Sato K, Watanabe H. et al. J. Phys. Ther. Sci., 23, 161-169, 2011]。しかしながら、筋分化に関連する細胞接着や細胞形態の機序についての研究はいまだに少ない。以上のように、confluent state を現わす細胞数も、またその結果にも統一性が見られず、現在のところ community effect を確認するエビデンスが存在しない。

一方、筋分化誘導には培養細胞の密集状態(confluent state)の必要性が最初の報告で指摘されているが、その詳細な機序は明らかにされていない。1993 年に、Gurdon 等は、カエルの発育の中で筋肉の発生には 100 個以上の細胞の群生が必要であることを報告し、community effect（群生効果）として報告した[Gurdon et al Cell 75, 831-834, 1993]。この community effect により制御される筋分化に関与する分子機序についての報告は少なく、可溶性因子として TGF-beta、細胞表面の接着因子として N-cadherin や cell adhesion molecules (CAMs)が指摘されるが[Krarss RS, J. Cell Sci., 118, 2355-2362, 2005]、確証に至っていない。その理由は、community effect を調べるために筋分化に影響する confluent state を現わす細胞数が確立されていないからである。

２．研究の目的

（１）C2C12 の筋分化における community effect を確認するために、十分に分化が確認される濃度（1.6 x 10^4 cells/cm^2）を基準に[Yaffe D, Saxel O. Nature, 270, 725-727, 1977]、希釈を繰り返し、血清濃度変化などの分化誘導条件は変えずに分化の発現を確認し community effect を数量的に明らかにすることである。また、community effect が有意に確認できる細胞濃度の確定に至ったところで、microarray を用いてその community effect に関与する分子種を明らかにし、community effect に関わる分子メカニズムを解明することである。

（２）一方、私たちはこれまでに WISH 型股関節装具は、痛みのある変形性股関節症（hip OA）患者の股関節機能と歩行を改善する事を明らかにした。 この装具の効果は、疼痛軽減によって可能になる毎日の歩行が必須であり、股関節周囲の筋力の増加を必要とすると考えられている[Sato T, et al. Rheumatol. Int., 28, 419-428, 2008]。筋分化によってもたらされる臨床的効果は筋力の増強であり、臨床的有用性をリハビリテーションの分野で確認するために、股関節の装具の効果を Timed up and go (TUG) test で明らかにすることも臨床応用の観点から本研究の目的とした。

３．研究の方法

（１）培養細胞及び培養方法：C2C12 筋原細胞の筋分化における community effect を確認するために、十分に分化が確認される濃度（1.6 x 10^4 cells/cm^2）を基準に[Yaffe D et al. Nature, 270, 725-727, 1977]、4 倍希釈し、4 x 10^3 cells/cm^2、1 x 10^3 cells/cm^2、2.5 x 10^2 cells/cm^2、の 4 段階の細胞密度で培養皿に播き、3 日間維持培養液で培養し、血清濃度を下げた分化誘導培養液に変えて筋分化を解析した。筋細胞への分化分子マーカー検索：蛋白発現は、免疫蛍光抗体法と immunoblot 法を用いて、ミオシン重鎖蛋白（Myosin Heavy Chain, MHC）の発現を検索した[Sato K, Watanabe H. et al. J. Phys. Ther. Sci., 23, 161-169, 2011]。mRNA メッセージの発現は、PCR を用いて、Myogenin と MyoD について Montarras D, et al.[Montarras D, et al. Science, 309, 2064-2067, 2005]に従って解析した。さらに、分化発現に関連する細胞密度が確立された時点で、異なった細胞密度で分化させた細胞から RNA を採取し、microarray を用いてその community effect に関与する分子種を明らかにした。

（２）筋力増強効果の一つとして下肢のバランス改善が期待されるので、歩行と方向転換、椅子の立ちしゃがみ動作を含んだ複合運動である Timed up & go test (TUG)を計測して、この装具が TUG に及ぼす効果を解析した。

４．研究成果

（１）培養系における C2C12 筋原細胞の筋分化における community effect

本研究課題では、C2C12 の筋分化における community effect を確認するために、十分に分化が確認される濃度（1.6 x 10^4 cells/cm^2）を基準に、4 倍希釈を繰り返した濃度で増殖を調べたところ、指数増殖の速さには変化が見られないが、増殖期に移行するまでの時間が濃度依存的に短縮されることが明らかとなった。培養 3 日目では濃度依存的に多核融合細胞の出現頻度が増していた。MHC の蛋白発現は細胞濃度依存的に増加してたことが疫蛍光抗体法と immunoblot 法にて確認された。Myogenin と MyoD の mRNA の発現は濃度依存的に高くなっている事が確認された。Microarray 解析から、細胞の高濃度培養では CDKIp21 を含む増殖抑制因子や MyoD あるいは myogenin 等の筋分化蛋白の発現が増強していた。興味深い事に、神経関連分子と考えられている Drebrin の RNA メッセージの発現増強が確認されたので、蛋白での発現状態を調べたところ、この蛋白が筋の分化に関与する事が明らかとなった。これらの結果から、C2C12 筋原細胞の筋分化には細胞増殖とそれに引き続いておこる接触増殖抑制 contact inhibition が必要である事が示唆された。以上の成果は、筋の国際専門雑誌 Muscle & Nerve に投稿し掲載された[Kanako Tanaka, Kaori Sato, Tomomi Yoshida, Toshio Fukuda, Kenji Hanamura, Nobuhiko Kojima, Tomoaki Shirao, Takashi Yanagawa, Hideomi Watanabe. Evidence for cell density affecting C2C12 myogenesis: possible regulation of myogenesis by cell-cell communication. Muscle & Nerve 44: 968-977, 2011]。

（２）筋分化がもたらす筋力増強効果の臨床的有用性

WISH 型股関節装具は、痛みのある変形性股関節症（hip OA）患者の股関節機能と歩行を改善するが、装具の効果は疼痛軽減によって可能になる毎日の歩行が必須であり、股関節周囲の筋力の増加を必要とすると考えられている。筋力増強効果の一つとして下肢のバランス改善を、歩行と方向転換、椅子の立ちしゃがみ動作を含んだ複合運動である Timed up & go test (TUG)で解析したところ、両側 hip OA 患者においては装具装着で約１秒の有意な短縮が見られた。また片側例では患側が外側になるターンのときだけ有意な短縮効果が見られた。装具装着なしでの改善効果も３ヶ月で現れ、観察最終期間１２ヶ月まで維持された。これらのことから、装具の直接効果は股関節外旋時に現れ、間接的効果は筋力の増強による事が示唆された。筋力の増強過程を臨床的に明らかにし、筋分化がもたらす筋力増強が臨床で大きな役割を果たす事を示したものであり、これらの結果はリハビリテーションの専門雑誌 Prostetics & Orthotics International に投稿して掲載された[Ena Sato, Takahisa Sato, Takehiko Yamaji, Hideomi Watanabe. Effect of the WISH type hip brace on functional mobility in patients with osteoarthritis of the hip: Evaluation using the Timed Up & Go Test. Prosthetics & Orthotics International 2012, 36: 25-32]。

（３）培養系における細胞密度関連蛋白と幹細胞の分化検索関連の成果

Community effect に関する分子種探索の過程で細胞密度に関連する運動因子 autocrine motility factor (AMF)に着目した。AMF の観点からその分子の役割を解析したところ、ハイパーサーミアにおける細胞の運動能が抑制される機序には AMF の蛋白及び RNA メッセージの発現低下によって引き起こされていることが明らかとなった。本成果は 腫瘍の専門雑誌 Oncology Report に投稿して掲載された[Kosei Nakajima, Takashi Yanagawa, Hideomi Watanabe, Kenji Takagishi. Hyperthermia reduces migration of osteosarcoma by suppression of autocrine motility factor. ONCOLOGY REPORTS 28: 1953-1958, 2012]。

また、本研究課題の主要な筋に分化する筋原細胞は C2C12 細胞を用いる計画であったが, 非常に稀な疾患で筋細胞と同じ間葉系である骨の間葉系幹細胞の異常増殖が病態であると考えられる Gorham 病の患者の組織採取ができたために, 筋分化への異なったアプローチを目的にこの細胞培養に着手したが、長期培養株の確立には至らなかった。しかし、初期培養においては低酸素状態が増殖増強効果をもたらす事を明らかにし、かつ fibroblast growth factor (FGF)によく反応する事が明らかとなった。これらの結果は、多くの患者が死亡する中で、治癒に到達できた症例の報告と共に英文での報告を目指して運動器疾患の専門雑誌 Journal of Orthopaedic Science に投稿したところ臨床成果のみの報告として受理され、症例報告として掲載をすることができた [Toru Shimizu, Kaori Sato, Tomomi Yoshida, Atsushi Takahashi, Takashi Yanagawa, Naoki Wada, Makoto Sohmiya, Kenji Shirakura, Hideomi Watanabe. A case report of Gorham Stout syndrome remission. Journal of Orthopaedic Science, 2012: 17: 199-204]。

（４）まとめ

本研究では、当初の目的である筋原細胞 C2C12 の筋分化誘導において、培養細胞濃度による community effect を定量的にも定性的にも明らかにする事ができた。またその分子機序に関しても筋分化における細胞接着や可溶性蛋白の役割を解明した。しかし、本研究で明らかになった分子種のみで筋分化における community effect が発現しているとは考えにくい。一方、筋分化によってもたらされる

筋力増強効果は整形外科やリハビリテーション分野では重要な治療タスクであり、今後とも、筋分化の機序の解明には分子生物学を基盤とした基礎的アプローチと臨床アプローチ双方からの取組を続けていく必要を強く感じた。

（５）謝辞

これまでに記した研究成果は文部科学省科学研究費のご支援によるものであるが、大学院保健学研究科リハビリテーション学の皆様、生体情報検査科学講座教授、福田利夫氏、また大学院医学系研究科整形外科学講師、柳川天志氏の暖かいご支援に深謝するものである。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計４件）

① Kosei Nakajima, Takashi Yanagawa, Hideomi Watanabe, Kenji Takagishi. Hyperthermia reduces migration of osteosarcoma by suppression of autocrine motility factor. 査読有、ONCOLOGY REPORTS 28: 1953-1958, 2012. DOI: 10.3892/or2012.2066.

② Toru Shimizu, Tomomi Yoshida, Hideomi Watanabe,et al.（他６名、９番目）A case report of Gorham Stout syndrome remission. 査読有、Journal of Orthopaedic Science, 2012: 17: 199-204,Doi: 10.1007/s00776-011-0080-0.

③ Ena Sato, Takahisa Sato, Takehiko Yamaji, Hideomi Watanabe. Effect of the WISH type hip brace on functional mobility in patients with osteoarthritis of the hip: Evaluation using the Timed Up & Go Test. 査読有、Prosthetics & Orthotics International 2012, 36: 25-32. doi: 10.1177/0309364611427765.

④ Kanako Tanaka, Hideomi Watanabe, et al.(他７名、９番目). Evidence for cell density affecting C2C12 myogenesis: possible regulation of myogenesis by cell-cell communication. 査読有、Muscle and Nerve 44: 968-977, 2011.Doi: 10.1002/mus.22224

〔学会発表〕（計１２件）

① 渡辺秀臣、山路雄彦、佐藤江奈、佐藤貴久、田澤昌之、白倉賢二．変形性股関節症患者に対するWISH型股関節装具の歩行解析に及ぼす効果．3-9-1．第50回日本リハビリテーション医学会学術集会、東京、2013年6月13‐15日．

② 渡辺秀臣、佐藤江奈、山路雄彦、佐藤貴久、田澤昌之、白倉賢二．変形性股関節症患者のfunctional mobilityにおけるWISH型股関節装具の効果．3-9-2．第50回日本リハビリテーション医学会学術集会、東京、2013年6月13‐15日．

③ 佐藤貴久、山路雄彦、佐藤江奈、田澤昌之、白倉賢二、渡辺秀臣．変形性股関節症におけるWISH型股関節用S字型装具の股関節機能評価．3-9-3．第50回日本リハビリテーション医学会学術集会、東京、2013年6月13-15日．

④ 佐藤貴久、渡辺秀臣、割田敏朗、喜多川孝欽、内田訓、高岸憲二．WISH型股関節用S字型装具の股関節機能評価と歩行能力．3-Po-447．第86回日本整形外科学会学術総会、広島、2013年5月23-26日．

⑤ 佐藤貴久、渡辺秀臣、山路雄彦、佐藤江奈、内田訓、割田敏朗、喜多川孝欽、高岸憲二．WISH型股関節用S字型装具の股関節機能評価と歩行能力．第61回東日本整形災害外科学会．シンポジウム11、1-VI-S11-2．高崎、2012年9月21日、22日．

⑥ 柳川天志、齋藤健一、篠崎哲也、渡辺秀臣、高岸憲二．VEGF-Dは肉腫細胞のリンパ系システムへの侵入を促進する 1-8-21．第27回日本整形外科学会基礎学術集会、名古屋、2012年10月26日、27日．

⑦ 佐藤江奈、山路雄彦、佐藤貴久、渡辺秀臣．WISH型股関節装具のTimed Up&Go Testに及ぼす効果．第61回東日本整形災害外科学会、高崎、2012年9月21日、22日．

⑧ 山路雄彦、佐藤江奈、高橋将太、二宮誠、渡辺秀臣．階段昇降用大腿義足膝継手（NAL-knee）の昇段動作に有効な足部の検討、1-VI-19．第61回東日本整形災害外科学会、高崎、2012年9月21日、22日．

⑨ 中嶋幸生、柳川天志、篠崎哲也、渡辺秀臣、高岸憲二．ハイパーサーミアおよびheat shock protein阻害剤による骨肉腫細胞株におけるautocrine motility factorの発現への影響 PS-123．第45回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、東京、2012年7月14日、15日．

⑩ 佐藤貴久、渡辺秀臣、割田敏朗、内田訓、高岸憲二．変形性股関節症におけるWISH型股関節用S字型装具の効果－QOLについて－．第85回日本整形外科学会学術総会、京都、2012年5月17日-20日．

⑪ 柳川天志、篠崎哲也、渡辺秀臣、高岸憲二．腫瘍転移におけるautocrine motility factorの役割．第26回日本整形外科学会基礎学術集会．シンポジウム2．前橋、2011年10月20日、21日．

⑫ 柳川天志、篠崎哲也、齋藤健一、渡辺秀臣、高岸憲二．骨硬化性病変におけるプロスタグランジンE2レセプターの発現．第44回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、京都、2011年7月14日・15

日.

６．研究組織

(1)研究代表者

渡辺　秀臣（WATANABE HIDEOMI）
群馬大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：40231724

(2)研究分担者

山路　雄彦（YAMAJI TAKEHIKO）
群馬大学・大学院保健学研究科・准教授
研究者番号： 90239997

(3)連携研究者

吉田　朋美（YOSHIDA TOMOMI）
群馬大学・大学院保健学研究科・助教
研究者番号：　00312893