

機械的ストレッチ刺激が ラット心臓由来 H9c2 筋芽細胞の分化におよぼす影響

元田弘敏 橋本直樹 中川昌幸
井上茂樹 加納良男* 平上二九三

Effect of Mechanical Stretching on the Differentiation of
H9c2 Myoblasts Derived from Rat Heart Tissues

Hirotoishi MOTODA, Naoki HASHIMOTO, Masayuki NAKAGAWA,
Shigeki INOUE, Yoshio KANO*, Fukumi HIRAGAMI

要 旨

筋芽細胞に伸展刺激を行い RT-PCR 法で MyoD, myogenin の mRNA の発現量を経時的に測定した。MyoD は 4 時間後には約 3 倍の発現量があり、myogenin は約 5 倍の発現量を示し 12 時間後にはいずれもコントロールレベルまで低下した。次に分化の程度を確認するために細胞核の融合率を計測した。伸展刺激 3 日後の核融合率において伸展刺激群はコントロール群に比べて有意な増加が認められた。これらの結果は機械的伸展刺激が MyoD, myogenin の mRNA を発現量の増加をもたらす筋芽細胞の分化を促進したことを示唆している。

キーワード：H9c2 細胞株、MyoD、myogenin、伸展刺激

Key words：H9c2 cells, MyoD, myogenin, Stretching

はじめに

骨格筋のストレッチ効果の人体や動物での個体レベルでの研究は今まで精力的になされてきた。さらに培養細胞を用いた細胞レベルでのストレッチ効果の分子細胞学的研究も最近散見されるようになった。しかし、理学療法で用いられる一般的な関節可動域訓練で用いられている程度の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証した研究は筆者の検索した限りでは見あたらない。

そこで本研究で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析した。我々は一般的な関節可動域訓練 (ROM-ex) を想定し、1 分間に 6 往復頻度で 15 分間伸展刺激後の MyoD と myogenin の mRNA の発現

量を RT - PCR 法で経時的に確認し、同時に筋芽細胞 (単核) から筋管細胞 (多核) への分化の程度を核の融合率を指標に検討した。

材料と方法

1. 細胞の培養

H9c2 細胞株は米国細胞バンク 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購入した。H9c2(2-1)細胞株は Kims らが胎児の 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。細胞は、牛胎児血清を 10% とカナマイシン (80 $\mu\text{g/ml}$) を加えた高グルコース型 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM 培地) を用いた。伸展刺激前には細胞の分

吉備国際大学保健科学部理学療法学科
〒716-8508 岡山県高梁市伊賀町 8
*吉備国際大学保健科学部作業療法学科
〒716-8508 岡山県高梁市伊賀町 8

Department of Physical Therapy, School of Health Science, KIBI International University
8, Iga-machi, Takahashi-City, Okayama, Japan, 716-8508

* Department of Occupational Therapy, School of Health Science, KIBI International University
8, Iga-machi, Takahashi-City, Okayama, Japan, 716-8508

化を誘導するために牛胎児血清の濃度を 10% から 3% に減らした。

細胞の培養は炭酸ガス培養器を用いて湿潤な 5% CO₂、37℃で行い、培地交換は 3 日おきに行った。継代は、細胞がフラスコ (FALCON, 25cm²) に 70% から 80% になると 0.25% トリプシンで処理し 1/3 から 1/4 を新しいフラスコに播き直すという方法で行った。

2. 機械的伸展刺激

伸縮可能なシリコン性のチャンバーの底面をコラーゲン膜でコーティングし、細胞がほぼ 100% confluence (培養細胞が接着面に 100% 密集して広がった状態) で伸張率: 4%、刺激の頻度: 6 往復/分、刺激時間: 15 分で培養細胞伸展装置 NS-550 (スカラテック、大阪) を用いて伸展刺激を行った。伸展刺激前に細胞の牛胎児血清の濃度を 10% から 3% に減らした。

3. RT-PCR

1) total RNA の抽出と cDNA 合成

total RNA の抽出は 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 μg の total RNA を計 33 μl の反応系 (Bulk first-strand reaction mix 11 μl, oligo (dT) 18 primer 1 μl, DDT solution 1 μl, RNA 20 μl) で 37℃ 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

MyoD の Forward primer と Reverse primer はそれぞれ 1) GGGACACAGACTTGCTA と 2) GCCGCTGTAATCCATCA で、myogenin の primer はそれぞれ 1) GACCGAGCTCAGCTTAA と 2) CATCTGGGAAGGTGACA を用いた¹⁾。

3) PCR 反応

PCR 反応は TaKaRa LA Taq (Takara, Japan) で行い計 10 μl 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 μl 使用した。反応としては 94℃ イニシャルデナチュレーション 30 秒後に 94℃ デナチュレーション、52℃ アニーリング、72℃ イクステンションそれぞれ 30 秒を 25 サイクル行った。反応終了後、1.5% アガロースゲルの各レーンに反応液 5 μl を注入し電気泳動を行った。泳動終了後ゲルは臭化エチジウムで染色され UV トランスイルミネーターで紫外線照射中に写真撮影された。

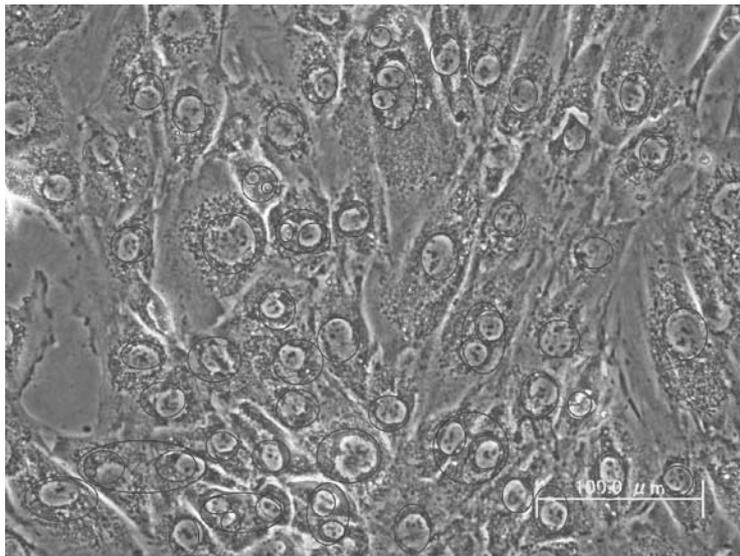


図1 位相差顕微鏡での分化誘導の観察および細胞核のマーキング

H9c2 細胞を位相差顕微鏡 (200倍) で写真撮影した。写真中の全ての細胞核を赤色でマーキングし、複数個の核を持つ細胞は青色でマークした。核の融合率は、(筋管細胞に取り込まれた核の数/総核数 × 100 (%)) で算定した。

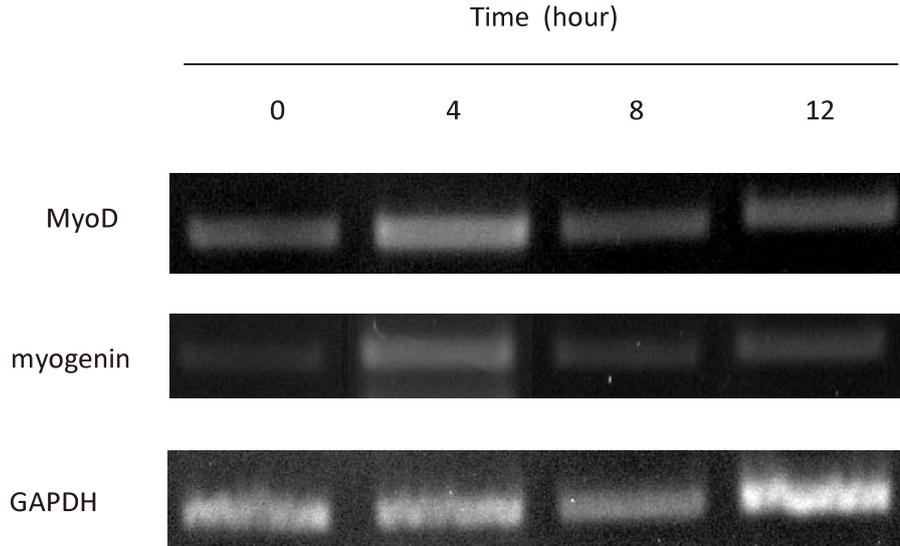


図2 MyoD, myogenin の mRNA の発現量の経時的变化

MyoD, myogenin および GAPDH の mRNA の機械的伸展刺激前、伸展刺激 4 時間後、8 時間後、12 時間後の発現量の経時的变化を表す。

4. 分化誘導の観察および細胞核の融合率の計算

細胞をコントロール群と伸展刺激群に分け、細胞の形質変化を顕微鏡下で経時的（2、3日後）に観察した（図1）。培養プレートからランダム選出した10視野を写真撮影後、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×100（%））を各視野で算定した²⁾。

結 果

1. MyoD および myogenin の mRNA の発現パターン

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時間後に比べ8時間後に減少、12時間後に増加していた（図2）。一般に、GAPDH の発現量は条件に依存せず一定の割合で発現していると考えられている。本実験で結果のばらつきはそれぞれのサンプルでの cDNA の濃度が不均衡なために生じたものと解釈できる。そのため、MyoD と myogenin の結果は GAPDH を一定量として補正した。

1) MyoD

MyoD はコントロール群（伸展刺激前）で一定の発現量が確認された。伸展刺激後、コントロールに比べ4時間後には約3倍の発現量があり、8時間後

には低下がはじまり、12時間後にはコントロールレベルまで低下した（図2）。

2) myogenin

4時間後には約5倍の発現量があり8時間後には低下がはじまり、12時間後にはコントロールレベルまで低下した（図2）。MyoD と myogenin の mRNA の発現パターンは傾向としてはほぼ同様の傾向を示した。

2. 伸展刺激後の細胞核の融合率の変動

伸展前の核の融合率は19.9%であった。伸展刺激後2日目の核の融合率はコントロール群で32.4%、伸展刺激群は34.5%であった。それに対して、伸展刺激3日目の核の融合率はコントロール群で37.0%、伸展群では45.5%となりコントロール群に比べ伸展刺激群の方が細胞核の融合率は8.5%増加した（図3）。

考 察

生体内において骨格筋は日常的な微少な損傷に対して恒常的に修復が繰り返されている。骨格筋の幹細胞である筋衛生細胞（サテライト細胞）がこの修復に関わっている。つまり、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

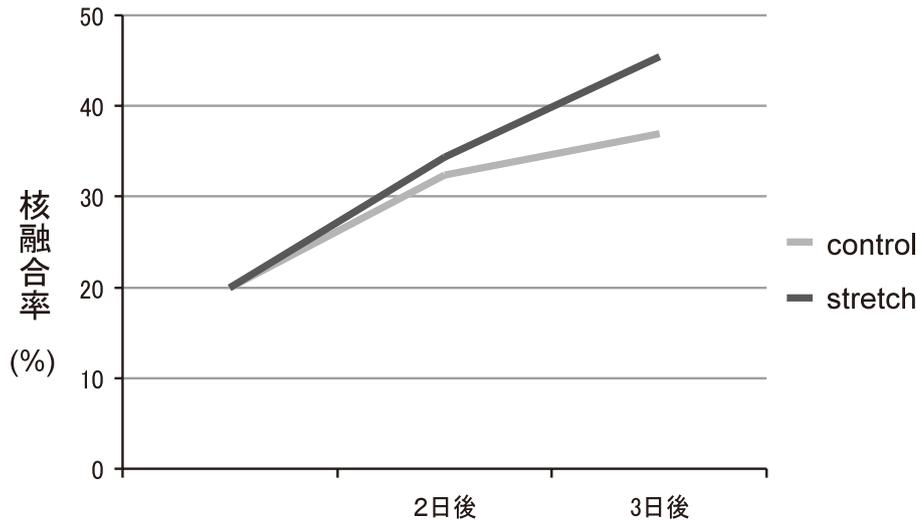


図3 伸展刺激後の細胞核の融合率の変動

伸展刺激群 (stretch) は伸展刺激前、2日後、3日後の核融合率を表している。Control 群は伸展刺激無しでの2日後、3日後の核融合率を表している。両群とも血清濃度を実験開始時に10%から3%に減らして分化を促進した。

管細胞、筋線維と分化が進むことで骨格筋として再生するといわれている。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³⁻⁵⁾。

理学療法の臨床現場では理学療法士による骨格筋のストレッチは関節可動域訓練として日常的に行われている一般的な医療行為である。骨格筋のストレッチ効果の検証として人体レベルで主に筋の硬度を指標として多数の報告がなされている。さらに、最近マウスなどの実験動物を材料に MyoD ファミリーを指標とした報告がされるようになってきた。細胞レベルにおいては、新しい分野であり、刺激方法の困難さから報告は少ない。弓削はラット骨格筋細胞 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を考案し恒常的に15日以上伸展刺激をかけ続けた⁶⁾。しかし、実際の理学療法士の関節可動域訓練は伸展、弛緩を繰り返し、しかも訓練時間は15分程度と比較的短時間である。そのため、臨床に即した条件で伸展刺激を加え、細胞レベルでの影響を検討することが必要不可欠である。

我々はこれまで科学的根拠に基づいた理学療法 (EBPT (evidence based physical therapy)) を目指し、

臨床で行われている物理療法での極超短波療法 (マイクロウエーブ) や温熱療法の基礎的研究としてラット神経細胞、マウス繊維芽細胞やヒト正常繊維芽細胞を用いて極超短波や温熱刺激による細胞応答を分子細胞学的に解析してきた⁷⁻¹⁴⁾。骨格筋の研究としてはラット心臓由来筋芽細胞でありながら多核の筋管細胞に分化 (骨格筋様分化) することが知られ¹⁵⁾、多くの骨格筋の研究に用いられている H9c2 細胞が MyoD と myogenin を発現していることを RT-PCR 法で証明し、ラット心臓由来の筋芽細胞 H9c2 の骨格筋様分化に MyoD ファミリーが関わっていることを証明した¹⁾。

伸展刺激により MyoD の mRNA は4時間後にはコントロール (伸展前) に比べ約3倍の発現量があり、myogenin の mRNA は約5倍の発現量を示し、12時間後にはいずれもコントロールレベルまで低下した。このことは、本実験で用いた機械的伸展刺激が細胞レベルでは筋肉の再生に好影響を与えた可能性を示唆している。また、刺激後4時間という早期に MyoD と myogenin の増加が確認されたことは注目に値する。つまり、MyoD と myogenin の mRNA の発現量を指標に伸展刺激の効果を早期に判定できる可能性を示している。

また、MyoD と myogenin の mRNA の発現パター

ンはほぼ同様の傾向を示した。一般的には MyoD はサテライト細胞から筋芽細胞への運命決定に、myogenin は筋芽細胞から筋管細胞への分化に重要な働きをしていると言われている¹⁶⁾。本実験では筋芽細胞を用いたため myogenin の発現が予想されたが実際には MyoD も同様な発現パターンを示した。本実験ではコントロール群（伸展前）に MyoD と myogenin の mRNA は一定量の発現が認められ、さらに機械的伸展刺激で MyoD と myogenin の mRNA の発現量の増加が認められた。これは Yablonka-Reuveni (2001) らがチキンの胎児から筋芽細胞を精製、培養をおこない分化を促進した際の MyoD と myogenin の mRNA の発現パターンと類似する¹⁷⁾。本実験の結果は機械的伸展刺激による筋芽細胞の分化に MyoD と myogenin の両遺伝子が重要な働きをしている可能性を示唆するものである。

次に細胞核の融合率の実験について、伸展前の核の融合率は 19.9%であった。これは細胞が 100% confluence に達したために細胞の分化が一定量進んでいることことを意味する。伸展刺激 2 日目の核の融合率はコントロール群で 32.4%、伸展刺激群は 34.5%でありこの時点では明確な差は認められなかった。伸展刺激 3 日目の核の融合率はコントロール群で 37.0%となり、コントロール群でも分化が進んでいた。これは伸展刺激前に細胞の分化を誘導するために牛胎児血清の濃度を 10%から 3%に減らしたことが原因と考えられる。一方、伸展群では 45.5%となりコントロール群に比べ伸展刺激群の方が細胞核の融合率は 8.5%増加した。すなわち伸展刺激 3 日後には伸展刺激群はコントロール群に比べて分化が促進されたことを意味する。

筋芽細胞を用いた本研究の結果は機械的伸展刺激による遺伝子レベル (MyoD と myogenin の mRNA) の発現量の増加が原因となって分化の促進 (細胞核の融合率の増加) が進行した可能性を強く示唆している。今後の課題としては、残りの MyoD ファミリー (Myf5, MRF4) の検討やタンパク質レベルでの解析、更には、機械的伸展刺激強度や頻度の検討などが残されている。

abstract

We examined mRNA levels of MyoD and myogenin in myoblasts after mechanical stretching by RT-PCR method. Both MyoD and myogenin mRNA levels were increased by stretching with similar time courses: maximal levels (3 fold and 5 fold, respectively) were observed at 4 hours. Next, we measured nuclear fusion rates in cells to confirm degrees of differentiation of the cells. Nuclear fusion rates of stretching groups were significantly increased at 3 days compared with control groups.

These results suggest that mechanical stretching promotes differentiation of the cells through the expressions of MyoD and myogenin.

引用文献

- 1) 元田弘敏、若竹雄治、井上茂樹、加納良男、平上二九三 (2008) : ラット心臓由来 H9c2 細胞株での MyoD および Myogenin mRNA 発現の解析, 吉備国際大学 保健福祉研究所研究紀要 10, 23-26
- 2) 戸塚 実、千葉美麗、三谷英夫 (2000) 骨格筋細胞に対する機械的伸展刺激の影響に関する研究、歯科基礎医学会雑誌 42(3)、233-244
- 3) Seale P, Asakura A, Rudnicki MA (2001) The potential of muscle stem cells. *Dev Cell* 1 (3) : 333-342
- 4) Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA (2002) Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* 159 (1) : 123-134
- 5) Schwartz RJ, Olson EN (1999) Building the heart piece by piece: modularity of cis-elements regulating Nkx2-5 transcription. *Development* 126 (19) : 4187-4192
- 6) 弓削 類 (2004) : 物理的刺激と生体反応 物理的刺激に対する細胞応答性、理学療法 31、253-258
- 7) Fukumi Hiragami, Hirotoshi Motoda, Toshiaki Takezawa, Chiyuki Takabayashi, Shigeki Inoue Yuji

- Wakatake and Yoshio Kano (2009) Heat Shock-Induced Three-Dimensional-Like Proliferation of Normal Human Fibroblasts Mediated by Pressed Silk. *Int. J. Mol. Sci.*, in press
- 8) Hiroyasu Murai, Fukumi Hiragami, Kenji Kawamura, Hirotohi Motoda、他 (2009) : Differential Response of Heat Shock-Induced p38 MAPK and JNK Activity in PC12 Mutant and PC12 Parental Cells for Differentiation and Apoptosis, *Acta Med.Okayama*, in press
- 9) 若竹雄治、元田弘敏、井上茂樹、加納良男、平上二九三 (2008) : 温熱刺激による細胞損傷と機能回復の分子生物学的解析, 吉備国際大学保健福祉研究所研究紀要 10, 27-32
- 10) Shigeki Inoue, Hirotohi Motoda, Yoshihisa Koike, Kenji Kawamura, Fukumi Hiragami, Yoshio Kano (2008) : Microwave irradiation induces neurite outgrowth in PC12m3 cells via the p38 migration-activated protein kinase pathway. *Neuroscience Letters*, 432(1), 35-39
- 11) 井上茂樹、元田弘敏、若竹雄治、加納良男、平上二九三 (2008) : 正常ヒト細胞と平面絹の混合培養による三次元様増殖を指標とした温熱刺激の効果, 総合リハビリテーション 36(8), 791-796
- 12) 井上茂樹、元田弘敏、若竹雄治、加納良男、平上二九三 (2008) : 正常ヒト細胞と平面絹の混合培養による三次元様増殖を指標とした温熱刺激の効果, 総合リハビリテーション 36(8), 791-796
- 13) 平上二九三、元田弘敏、井上茂樹、秋山純一、小池好久、竹澤俊明、高林千幸、加納良男(2007) : 熱ショックと平面絹による培養細胞の増殖形態の変化、吉備国際大学保健科学部研究紀要 12、51-60
- 14) Koike Y, Iwamoto S, Fukumoto Y, Hiragami F, Kawamura, K, Motoda H, Kano Y (2006) : Uvc irradiation induces neurite outgrowth in PC12m3 cells via theP38 mitogen-activated protein kinase and transcription factor Creb pathway. *Tissue Culture Research Communi*, 25, 129-136
- 15) Kimes BW, Brandt BL (1976) Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res*, 98, 367-381
- 16) 朝倉淳動 (2004) : 動き出す心筋創生 骨格筋の再生と骨格筋幹細胞の心臓への移植療法、分子心血管病、5(3)、254-262
- 17) Zipora Yablonka-Reuveni and Bruce M. Paterson MyoD and Myogenin (2001) : Expression Patterns in Cultures of Fetal and Adult Chicken Myoblasts *J Histochem, Cytochem*, 49(4), 455-62