

低出力パルス超音波は
マウス筋芽細胞の分化を促進する

げん たいゆう
玄 太裕

本論文の要旨は，第162回朝日大学大学院歯学研究科発表会（平成26年11月4日，岐阜）において発表した．本論文の一部は第138回日本歯科保存学会（平成25年6月28日，福岡）において発表した．

緒 言

筋肉の正常な形成は個体の発生や生存に必要不可欠である。筋肉は収縮能を持つ線維状の多核細胞の集合体であるが、これは筋芽細胞と呼ばれる単核の前駆細胞が分化することにより形成される¹⁾。筋分化は多段階からなり、その過程において筋芽細胞は細胞周期を離脱し筋特異的な遺伝子を発現して互いに融合することにより線維状の多核細胞(筋管細胞)を形成する¹⁾。筋分化は主に MyoD ファミリー(MyoD, Myf5, Myogenin, MRF4)と MEF2 ファミリー(MEF2A, MEF2B, MEF2C, MEF2D)と呼ばれる2つの転写因子ファミリーによって制御されている^{2,3)}。これらの転写因子やその他の転写共役因子が適切なタイミングで協調的に機能し、筋特異的な遺伝子を転写することにより筋分化を制御している。また、細胞融合という筋分化に特徴的な現象⁴⁾は、MyoD や MEF2 ファミリーによって制御されるのではなく MAPキナーゼ経路である ERK5 経路が Klf2 または Klf4 を介して活性化させている⁵⁾。下出ら⁶⁾は 3MHz, 70mW/cm² の低出力パルス超音波⁷⁾(low-intensity pulsed ultrasound: LIPUS)をマウス筋芽細胞 C2C12 に照射し、照射1時間後および照射24時間後における遺伝子発現を検討し、筋分化のマーカである MyoD の遺伝子発現量が照射1時間後に増加し、逆に照射24時間後には抑制されることを明らかにした。本実験では分化誘導後に LIPUS を照射し 2, 3,

5, 7日後の遺伝子発現量をリアルタイムPCR法を用いて定量することで, LIPUS照射が筋線維へ分化中のC2C12細胞の遺伝子発現パターンに対して, 長期的にどのような影響を与えるか検討した.

また近年, 小さなRNA分子であるマイクロRNA(miRNA)が同定され, 多くの生命現象を制御していることが明らかになってきた⁸⁻¹⁰⁾. miRNAはメッセンジャーRNA(mRNA)と異なりタンパク質をコードしない. その大きさは約21~23塩基の小さな一本鎖RNAであり, 植物から哺乳類に至るまで大部分が進化的に保存されている^{11, 12)}. miRNAの機能として, mRNAからタンパク質への翻訳抑制やmRNA分解による転写後制御が推定されている^{13, 14)}. 現在までに筋に存在するmiRNAがいくつか報告されており, 特にmiRNA-1, miRNA-133a, miRNA-133b, miRNA-206, miRNA-208b, miRNA-486, miRNA-499等は骨格筋中に豊富に存在することが確認されている¹⁵⁻¹⁹⁾. これら骨格筋に存在するmiRNAの発現は, その多くがMRFs(myogenic regulatory factors)などの転写因子によって制御されている. これらの転写因子には, MEF2²⁰⁾やMyoD²⁾, Myogenin²¹⁻²³⁾も含まれている. 骨格筋に存在するmiRNAは, MRFs等の筋分化を制御する鍵となる遺伝子の調節を通して, 筋の成熟や機能に多面的な影響を及ぼすと考えられている. 今回, C2C12細胞へのLIPUS照射が筋分化過程においてmiRNAの発現にどのよう

な影響をもたらすかを調べた。

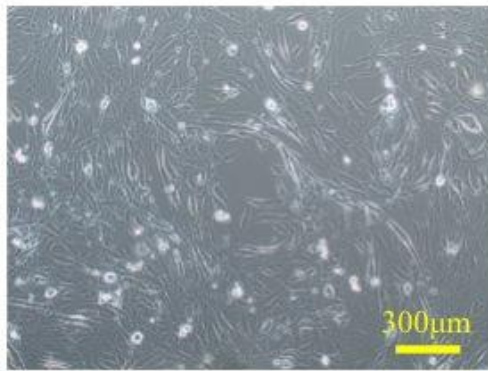
材料および方法

1. C2C12細胞の培養方法

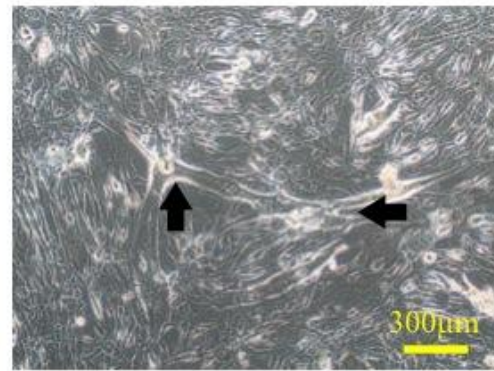
実験には，マウス骨格筋由来の筋芽細胞株 C2C12 (ATCC, Manassas, VA, USA)を用いた．増殖用培地には非働化 (56℃, 30分)した 10% ウシ胎仔血清 (Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA)を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (SIGMA, St.Louis, MO, USA)を用いた．分化誘導培地には非働化 (56℃, 30分)した 3% ウマ血清 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)を含む DMEMを用いた．図 1 に増殖培地と分化誘導培地における C2C12細胞の代表例を示す．細胞は 37℃, 5% CO₂の条件下で培養した．培養液の交換は 2～3日に1回の頻度とした．

継代は，0.25% Trypsin+EDTA (GIBCO, Grand Island, NY, USA)を用いて 37℃, 3分間処理した後に細胞を剥がし，1:20に希釈して培養皿に播種した．

細胞数は細胞懸濁液に 0.5% トリパンブルー溶液 (Wako, 大阪)を 1/25倍量加え，Burker-Turk血球計算盤を用いて算出した．



増殖培地にて培養



分化誘導 7 日目

図 1 C2C12 細胞の形態変化
矢印は筋細胞に分化した多核細胞を示す

2. LIPUS の照射

12 穴マルチウェルプレート (IWAKI, 東京) に $2.8 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ の細胞密度で C2C12 細胞を播種した。翌日には単核の筋芽細胞が増殖し、この状態で分化誘導培地に交換した。分化誘導を開始して 17 時間後に骨折治療装置 (BR Sonic Pro, 伊藤超短波, 東京) を用いて LIPUS を照射した (図 2)。照射の条件は 3MHz, 70 mW/cm^2 , 15 分間とした。照射に際して図 3 のようにプローブの上にゲルを塗布し、12 穴マルチウェルプレートを固定した。LIPUS を照射したものを照射群、照射していないものを非照射群とした。照射群、非照射群ともに分化誘導 18, 20, 23, 28 時間後、2, 3, 5, 7 日後 (LIPUS 照射 1, 3, 6, 11 時間後、1, 2, 4, 6 日後) にトータル RNA を採取した (図 2)。



図 2 LIPUS 照射と RNA 採取のスケジュール

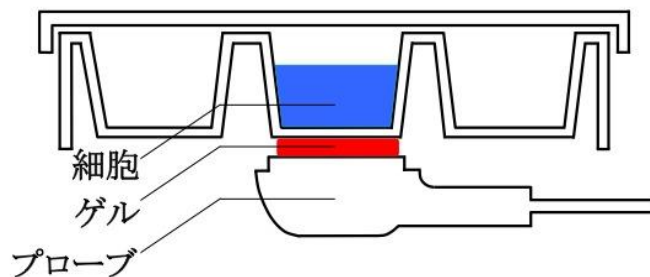


図 3 LIPUS の照射方法

3 . 免疫染色

分化誘導 4 日後 (LIPUS 照射 3 日後) に C2C12 細胞の免疫染色を行った。12 穴マルチプレート上の C2C12 細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 回洗浄した後, 4 % パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (ナカライテ

スク, 京都)を用いて 10 分間室温で固定した。PBS で 2 回洗浄し 0.1% NP-40 in PBS を加えて 15 分間放置した後, さらに PBS で 2 回洗浄した。ブロッッキングには 3%ウシ血清アルブミン(ナカライテスク, 京都)を用いて 30 分間反応させ, その後に 200 倍希釈した抗ヒトミオシン重鎖モノクローナル抗体(抗 MHC 抗体, clone, Doylestown, PA, USA)と 37°C で 1 時間反応させた。その後 PBS で 3 回洗浄し, 1,000 倍希釈した Alexa Fluor 488 標識 Anti-mouse IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を 37°C で 1 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄後, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 含有蛍光退色防止剤 (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)で封入し, 蛍光顕微鏡で観察した。なお, 細胞の長径の測定には解析ソフト (BZ-II 解析アプリケーション, Keyence, 大阪)を用いた。得られた値は Student t-test ($p < 0.05$)により有意差検定を行った。

4. von Kossa 染色

12 穴マルチプレート上の分化誘導 7 日後 (LIPUS 照射 6 日後)の C2C12 細胞を PBS で 1 回洗浄し, クリーンベンチ内で 20 分間乾燥させた後に 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液を用いて 20 分間室温で固定した。PBS で 2 回洗浄し, さらに蒸留水で 2 回洗浄した。その後, Calcium Stain Kit (ScyTek Laboratories, Logan, UT, USA)を用いて製造者の手順書に従い von

Kossa 染色を行った。なお，コントロールとして骨分化誘導をかけたマウス骨芽細胞 MC3T3-E1 も同様の方法で von Kossa 染色を行った。

5. リアルタイム PCR

C2C12 細胞からのトータル RNA 抽出は，Sepasol-RNA 1 Super G (ナカライテスク，京都)を用いて製造者の手順書に従い行った。抽出したトータル RNA は使用するまで -80°C で保存した。トータル RNA から逆転写反応によって相補的 DNA (complementary DNA: cDNA) を合成した。逆転写反応は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, 大阪)を用いて製造者の手順書に従い実施した。合成した cDNA は使用するまで -30°C で保存した。

遺伝子の転写量を定量的に解析するためにリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (Real-time polymerase chain reaction: リアルタイム PCR) を実施した。リアルタイム PCR は LightCycler[®] Nano システム (Roche, Basel, Swiss) で，Thunderbird SYBR qPCR Mix Kit (TOYOBO, 大阪) を用い SYBR Green1 Dye assay (インターカレント法) を実施した。各実験条件から得られた cDNA を鋳型として用い，各遺伝子特異的プライマー (表 1) によって増幅した。反応は 95°C で 10 分間加熱した後， 95°C で 10 秒， 60°C で 60 秒， 72°C で 15 秒のサイクルを 40 サイクル繰り返した。増幅後，融解曲線

を作成することでプライマー二量体や非特異的増幅産物が発生していないことを確認した。標的遺伝子は ERK5 (extracellular-signal-regulated kinase 5) , Klf2 (kruppel like factor 2) , Cdh15 (cadherin 15) , MyoD (Myoblast determination protein 1) , Myogenin , MCK (muscle creatine kinase) を用いた。内部標準遺伝子は β -actin を用いた。

リアルタイム PCR によって得られた値は、比較 C_T 法 (Comparative threshold cycle method) により相対定量した。結果は標的遺伝子発現量を β -actin 発現量で正規化し、さらに標準サンプル (増殖培地で対数増殖している C2C12 細胞) での発現量との比率として示した ($n=3$)。

表 1 リアルタイム PCR で用いたプライマー配列

	Sense(5'-3')	Antisense(5'-3')	Length(base pair)
ACTB	GCCAACCGTGAAAAGATGAC	GAGGCATACAGGGACAGCAC	20
ERK5	CATAGGCAATGGGGCCTAC	TCTTCTTGATGGCCACCTG	19
Klf2	CTCAGCGAGCCTATCTTGCC	CACGTTGTTTAGGTCCTCATCC	22
Cdh15	CATCCCACCCATTAGTGTGTC	TCCCAGTGAACCTGTGCGATAGA	22
MyoD	AACTGCTCTGATGGCATGATG	TGGAGATGCGCTCCACTATG	20
Myogenin	CCTTGCTCAGCTCCCTCA	TGGGAGTTGCACACTGGTT	19
MCK	CTGACCCCTGACCTCTACAAT	CATGGCGGTCCCTGGATGAT	19

6 . miRNA 解析

逆転写反応は Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA)

を用いて製造者の手順書に従い，トータルRNAから一本鎖cDNAを合成した．合成した一本鎖cDNAは使用するまで -30°C で保存した．miRNAの転写量を定量的に解析するため，リアルタイムPCRを実施した．リアルタイムPCRはLightCycler[®] Nanoシステムで，SYBR Advantage qPCR Premix (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA)を用い，SYBR Green1 Dye assayを実施した．各miRNA特異的プライマー(表2、3)およびmRQ 3'プライマーによって，各実験条件から得られた一本鎖cDNAを増幅した．反応は 95°C で10分間加熱した後， 95°C で10秒， 60°C で60秒， 72°C で15秒のサイクルを40サイクル繰り返した．増幅後，融解曲線を作成することでプライマー二量体や非特異的増幅産物が発生していないことを確認した．標的miRNAはmiRNA-1b，miRNA-27a，miRNA-29b，miRNA-30a，miRNA-133a，miRNA-135b，miRNA-206，miRNA-208b，miRNA-486a，miRNA-499を用いた．内部標準遺伝子はU6 snRNAを用いた．リアルタイムPCRによって得られた値は，比較 C_T 法により相対定量した．結果は標的遺伝子発現をU6 snRNA発現量で正規化し，さらに標準サンプル(増殖培地で対数増殖しているC2C12細胞)での発現量との比率として示した($n=3$)．

表 2 miRNA解析で用いたプライマー配列

	Sequence(5'-3')	Length(base pair)
miRNA-1b	GGGTACATAAAGAAGTATGTGC	22
miRNA-27a	TTCACAGTGGCTAAGTTCCGC	21
miRNA-29b	TAGCACCATTGAAATCAGTGTT	23
miRNA-30a	TGTAACATCCTCGACTGGAAG	22
miRNA-133a	TTTGGTCCCCTTCAACCAGCTG	22
miRNA-135b	TATGGCTTTTCATTCTATGTGA	23
miRNA-206	TGGAATGTAAGGAAGTGTGTGG	22
miRNA-208b	ATAAGACGAACAAAAGGTTTGT	22
miRNA-486a	TCCTGTACTGAGCCCCGAG	19
miRNA-499	TTAAGACTTGCAGTGATGTTT	21

表 3 筋形成における miRNA の働き (15-19)

miRNA	働き
miRNA-1	MEF2によって活性化された筋遺伝子発現を抑制するHDAC4を下方制御することで筋芽細胞の分化と再生を促進する Pax3とPax7の発現を抑制することで骨格筋の終末分化抑制を解除することによって筋芽細胞の分化と再生を促進する
miRNA-27a	筋形成のインヒビターであるミオスタチンを下方制御することによって骨格筋肥大を誘導する Pax3の発現を抑制することで骨格筋の終末分化抑制を解除することによって筋芽細胞の分化と再生を促進する
miRNA-29	ポリコム蛋白質を抑制することによって筋分化を増強する
miRNA-30a	筋の遅筋化に関与する
miRNA-133a	SRF(serum response factor)の抑制を介して筋芽細胞の分化を促す
miRNA-135	BMP2の主要トランスドューサーであるSmad5を抑制することによって骨への分化を阻害する
miRNA-206	Pax3とPax7の発現を抑制することで骨格筋の終末分化抑制を解除することによって筋芽細胞の分化と再生を促進する
miRNA-208b	Sox6が負に制御している遅筋プログラムの抑制を解除する
miRNA-486	Pax3の発現を抑制することで骨格筋の終末分化抑制を解除することによって筋芽細胞の分化と再生を促進する
miRNA-499	Sox6が負に制御している遅筋プログラムの抑制を解除する

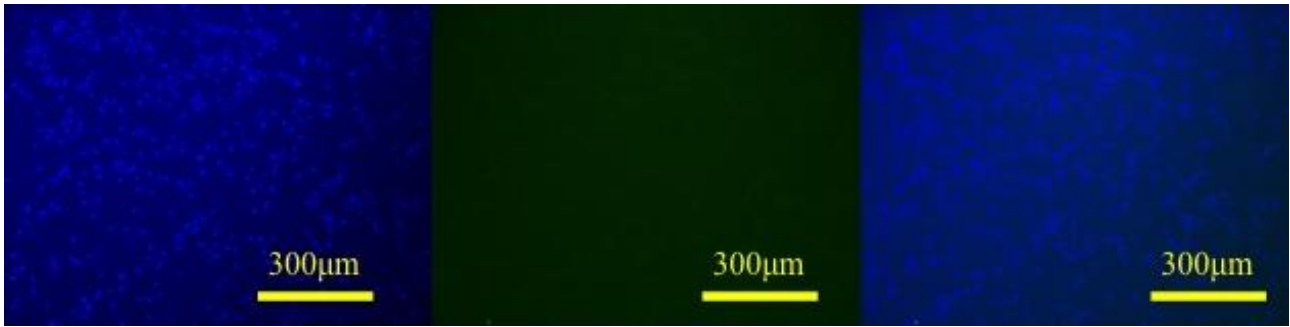
結 果

1 . LIPUS 照射により MHC 陽性細胞の出現が促進される

図 4 に示すように分化誘導 4 日後 (LIPUS 照射後 3 日後) では, 非照射群に比べて MHC 陽性の細胞が多数確認できた. また陽性細胞の長径も有意に長かった (照射群 $353.9 \pm 232.6 \mu\text{m}$, 非照射群 $192.2 \pm 126.2 \mu\text{m}$, 図 5). 一方, 分化誘導を行っていない増殖状態の細胞では MHC 陽性細胞は認められなかった (図 4).

2 . LIPUS 照射は C2C12 細胞の骨芽細胞への分化を誘導しない

照射群, 非照射群ともに C2C12 細胞ではカルシウムの沈着による von Kossa 染色陽性反応は確認できなかった (図 6). 一方, 対照として骨分化誘導をかけたマウス骨芽細胞 MC3T3-E1 ではカルシウム沈着を認めた (図 7).

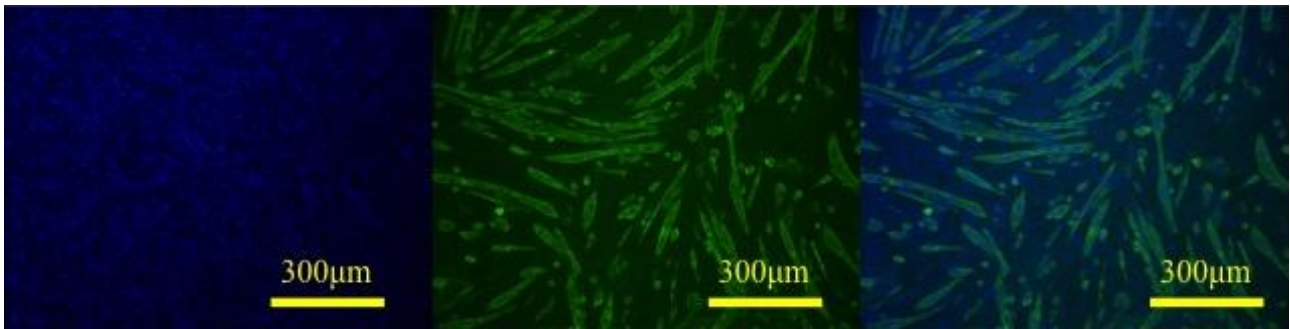


DAPI

抗 MHC

DAPI+抗 MHC

増殖培地にて培養

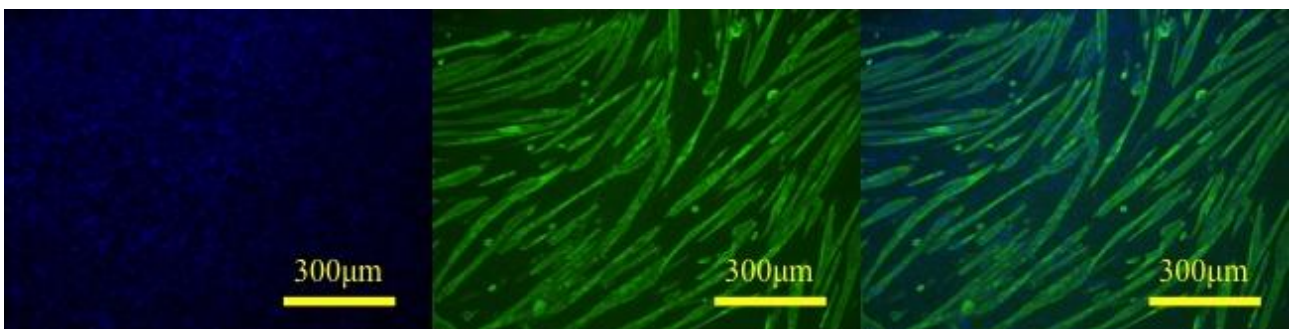


DAPI

抗 MHC

DAPI+抗 MHC

分化誘導 4 日後 (非照射群)



DAPI

抗 MHC

DAPI+抗 MHC

分化誘導 4 日後 (照射群)

図 4 免疫染色 (抗 MHC 抗体) の顕微鏡像

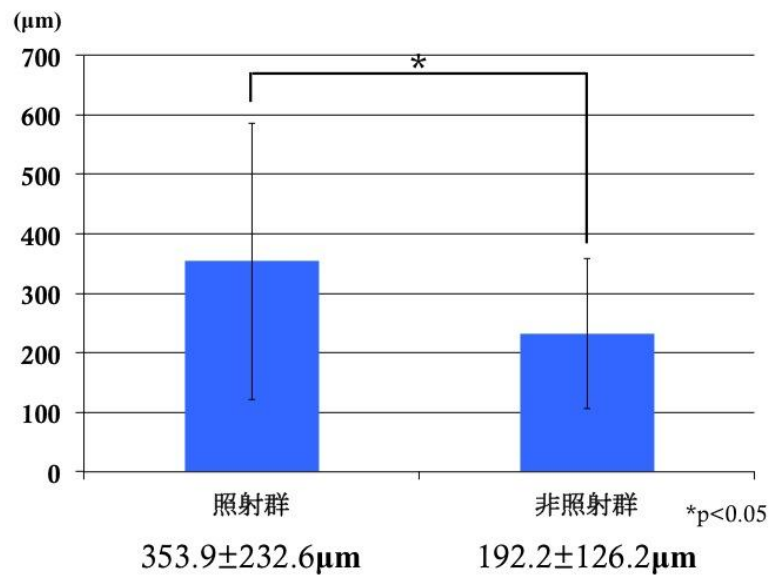
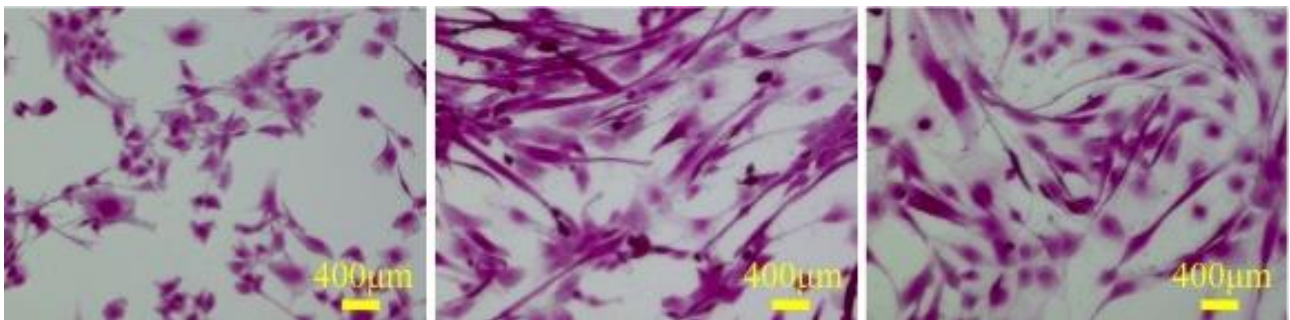


図 5 MHC 陽性細胞の長径



増殖培地にて培養

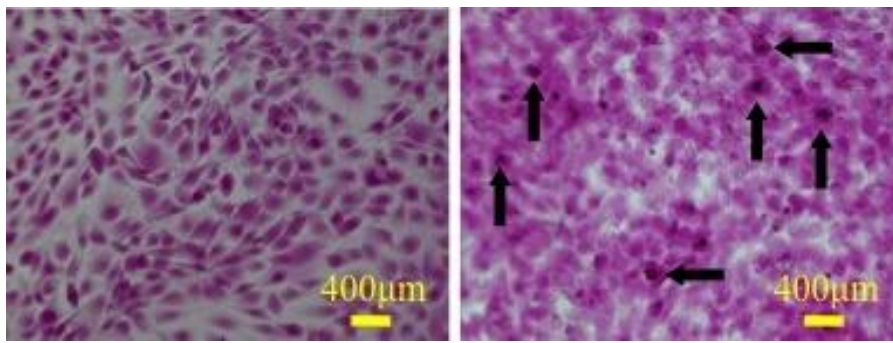
分化誘導 7 日後

分化誘導 7 日後

(非照射)

(照射 6 日後)

図 6 von Kossa 染色 (C2C12 細胞)



増殖培地にて培養 分化誘導 21 日後

図 7 von Kossa 染色 (MC3T3-E1 細胞)
矢印はカルシウム沈着を示す

3. LIPUS 照射は筋へ分化中の細胞の転写に影響を与える

ERK5 の転写量は分化誘導 23 時間後 (照射 6 時間後) に約 30,000 倍をピークとして著しく上昇し 2 日後にはベースレベル近くまで低下していた (図 8). LIPUS を照射すると ERK5 転写量のピークを迎える 23 時間後 (照射 6 時間後) に発現量がさらに 1.7 倍程度増強されていた. また分化誘導 7 日後 (照射 6 日後) にも発現量が 3 倍程度増強されていた.

Klf2 の転写量は ERK5 と同様に分化誘導 23 時間後 (照射 6 時間後) まで上昇を続け, その後少なくとも分化誘導 7 日後 (照射 6 日後) までは比較的高いレベルを維持していた (図 9). LIPUS 照射により分化誘導 23 時間後 (照射 6 時間後) の転写量のピークは, さらに 1.7 倍程度増強されていた.

Cdh15 の転写量は分化誘導 23 時間後 (照射 6 時間後) から 28 時間後 (照射 11 時間後) に約 10 倍近く上昇し,

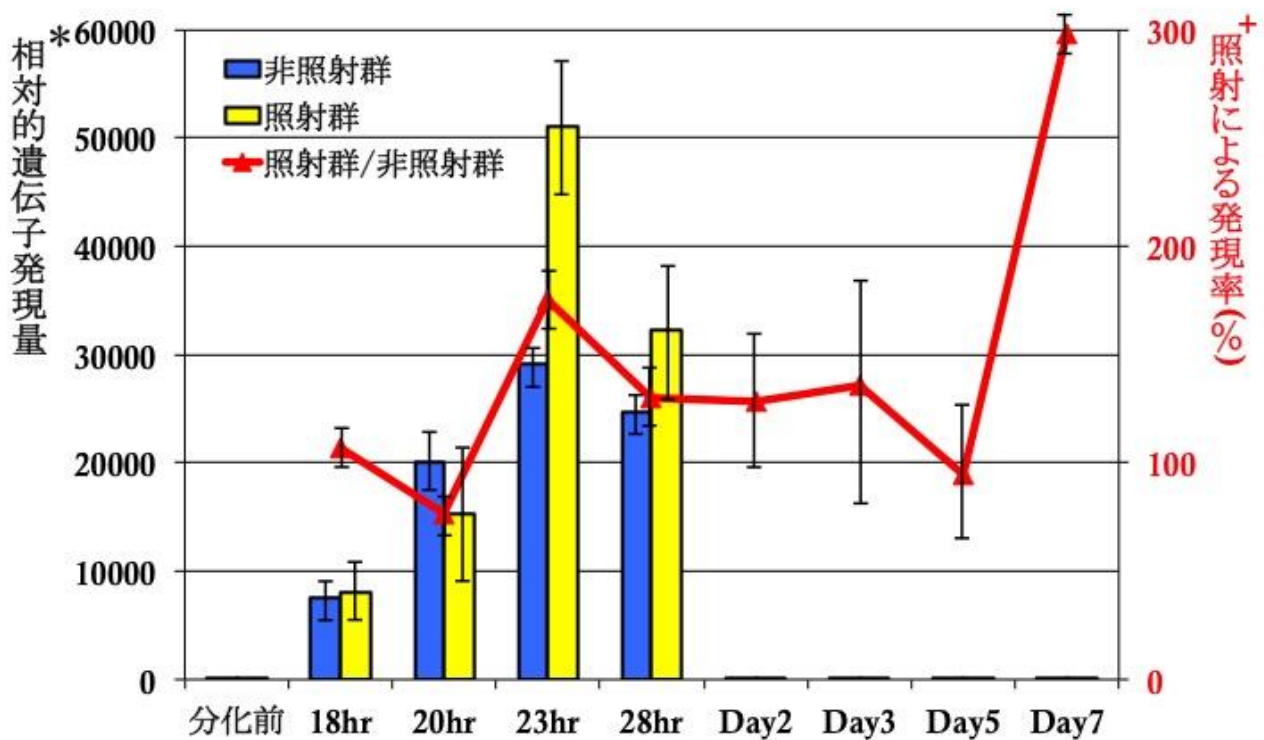
その後は多少の変動があるものの分化誘導 5 日後 (照射 4 日後) までは高いレベルを維持していた (図 10). LIPUS 照射により分化誘導 23 時間後 (照射 6 時間後) の転写量のピークはさらに 1.8 倍程度増強されていた. また Cdh15 は分化誘導 7 日後 (照射 6 日後) にも LIPUS 照射によって発現量が 2.2 倍程度増強されていた.

MyoD の転写量は分化誘導 23 時間後 (照射 6 時間後) から 28 時間後 (照射 11 時間後) をピークに約 3 倍近くまで上昇し, 分化誘導 2 日後 (照射 1 日後) には一旦低下するが分化誘導 3 日後 (照射 2 日後) から少なくとも分化誘導 7 日後 (照射 6 日後) までは再び上昇傾向にあった (図 11). LIPUS を照射すると分化誘導 23 時間後 (照射 6 時間後) の発現量のピークがさらに 2.4 倍程度増強された. また, 分化誘導 3 日後 (照射 2 日後) から分化誘導 5 日後 (照射 4 日後) にも LIPUS による増強作用が認められた.

Myogenin の転写は分化誘導 2 日後 (照射 1 日後) から急激に上昇し始め, 分化誘導 5 日後 (照射 4 日後) をピークとして約 8,000 倍まで増強した (図 12). LIPUS を照射すると, 分化誘導 3 日後 (照射 2 日後) から 7 日後 (照射 6 日後) に最大 3.5 倍に発現が増強されていた. また, 非照射ではそれほど転写量が上昇していない分化誘導 23 時間後 (照射 6 時間後) にも同程度の増強作用が認められた.

MCK は分化誘導 2 日後 (照射 1 日後) から徐々に転写

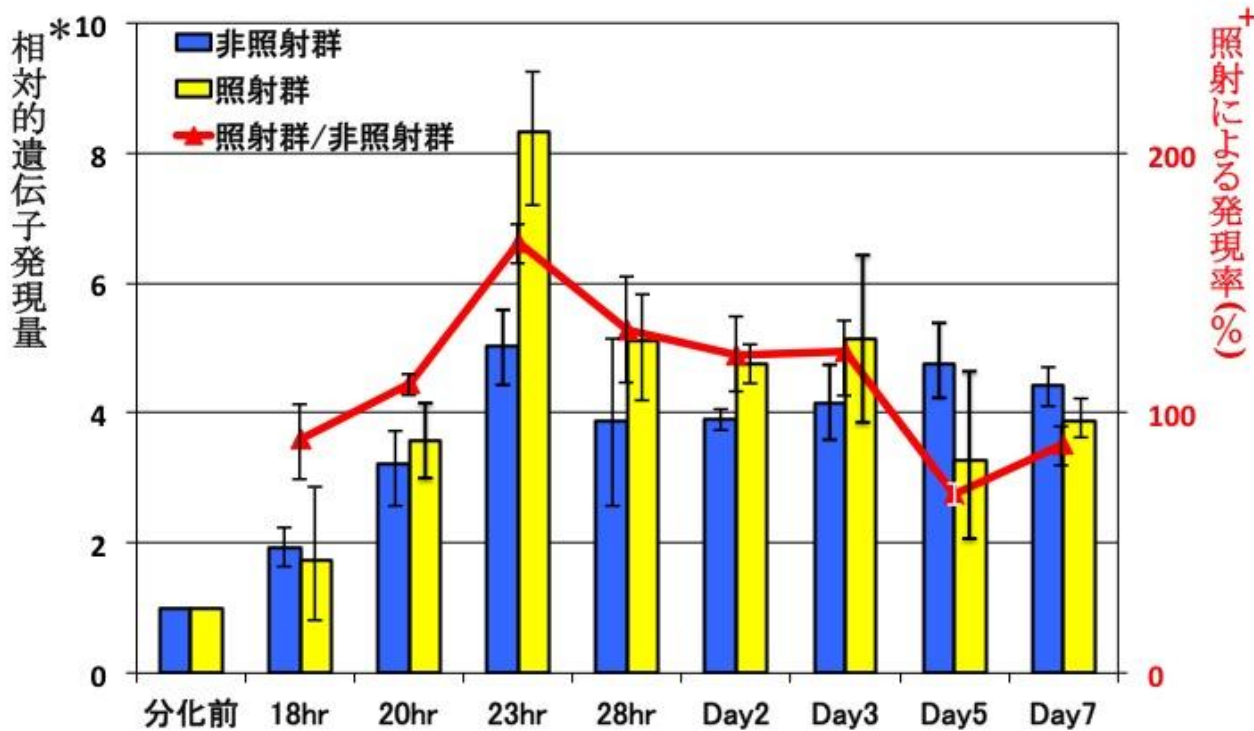
量が増加し，分化誘導 5 日後（照射 4 日後）には約 8,000 倍まで急激に活性化された（図 13）. LIPUS を照射すると分化誘導 28 時間後（照射 11 時間後）のより早い時期より発現量の増加が最大 2 倍程度認められた.



*分化誘導前の遺伝子発現量を1とする
 +非照射群の遺伝子発現量を100としたときのLIPUS照射による発現率

図 8 ERK5 の 転 写 量 (LIPUS 非 照 射 ・ 照 射 群 の 相 対 的 遺 伝 子 発 現 量 と LIPUS 照 射 に よ る 発 現 率)

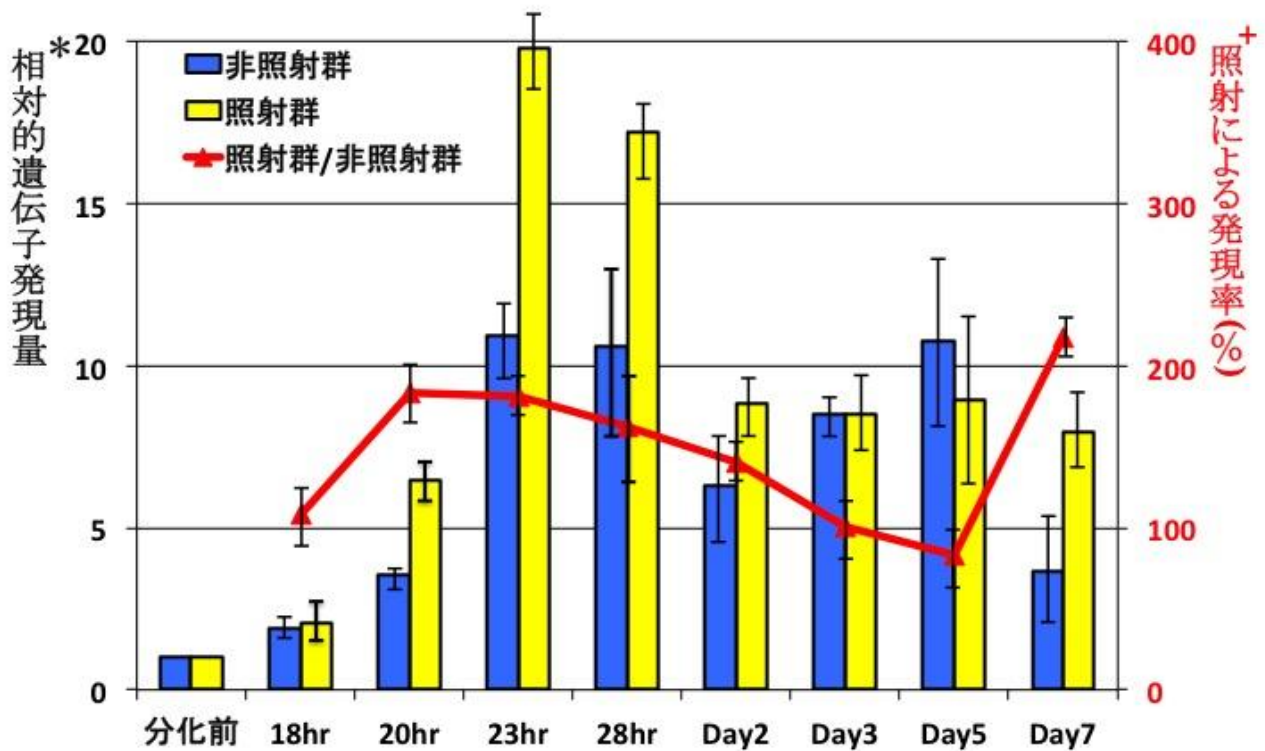
棒 グ ラ フ は 筋 へ の 分 化 誘 導 を し た 後 の 経 時 的 な 遺 伝 子 発 現 の 推 移 を , 増 殖 状 態 の C2C12 細 胞 に お け る 遺 伝 子 発 現 量 を 1 と し た 時 の 相 対 量 で 表 し て い る . 折 れ 線 グ ラ フ は LIPUS を 照 射 し て 分 化 を 行 っ て い る サ ン プ ル の 遺 伝 子 発 現 量 を , 同 時 点 で の 非 照 射 サ ン プ ル に お け る 遺 伝 子 発 現 量 を 1 と し た 時 の 比 (百 分 率) で 表 し て い る .



*分化誘導前の遺伝子発現量を1とする
 +非照射群の遺伝子発現量を100としたときのLIPUS照射による発現率

図 9 Klf2 の 転 写 量 (LIPUS 非 照 射 ・ 照 射 群 の 相 対 的 遺 伝 子 発 現 量 と LIPUS 照 射 に よ る 発 現 率)

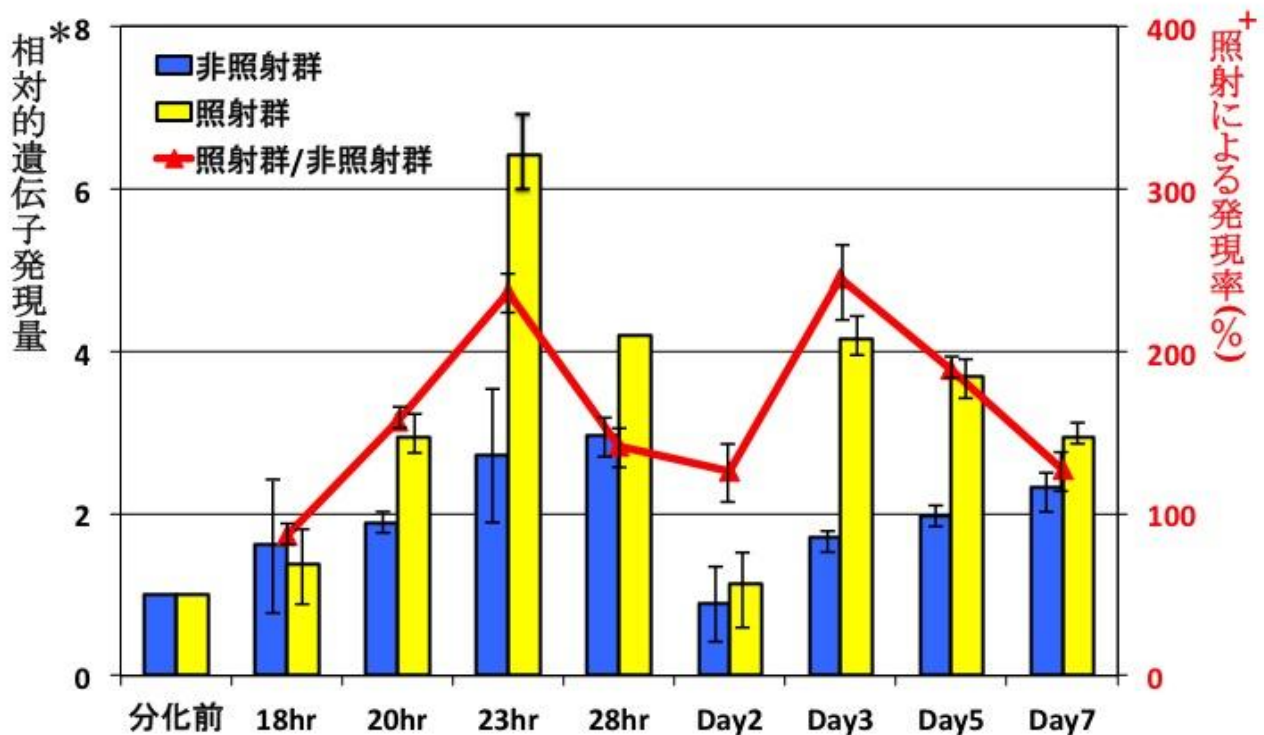
棒 グ ラ フ は 筋 へ の 分 化 誘 導 を し た 後 の 経 時 的 な 遺 伝 子 発 現 の 推 移 を , 増 殖 状 態 の C2C12 細 胞 に お け る 遺 伝 子 発 現 量 を 1 と し た 時 の 相 対 量 で 表 し て い る . 折 れ 線 グ ラ フ は LIPUS を 照 射 し て 分 化 を 行 っ て い る サ ン プ ル の 遺 伝 子 発 現 量 を , 同 時 点 で の 非 照 射 サ ン プ ル に お け る 遺 伝 子 発 現 量 を 1 と し た 時 の 比 (百 分 率) で 表 し て い る .



*分化誘導前の遺伝子発現量を1とする
 +非照射群の遺伝子発現量を100としたときのLIPUS照射による発現率

図 10 Cdh15 の 転 写 量 (LIPUS 非 照 射 ・ 照 射 群 の 相 対 的 遺 伝 子 発 現 量 と LIPUS 照 射 に よ る 発 現 率)

棒 グ ラ フ は 筋 へ の 分 化 誘 導 を し た 後 の 経 時 的 な 遺 伝 子 発 現 の 推 移 を , 増 殖 状 態 の C2C12 細 胞 に お け る 遺 伝 子 発 現 量 を 1 と し た 時 の 相 対 量 で 表 し て い る . 折 れ 線 グ ラ フ は LIPUS を 照 射 し て 分 化 を 行 っ て い る サ ン プ ル の 遺 伝 子 発 現 量 を , 同 時 点 で の 非 照 射 サ ン プ ル に お け る 遺 伝 子 発 現 量 を 1 と し た 時 の 比 (百 分 率) で 表 し て い る .

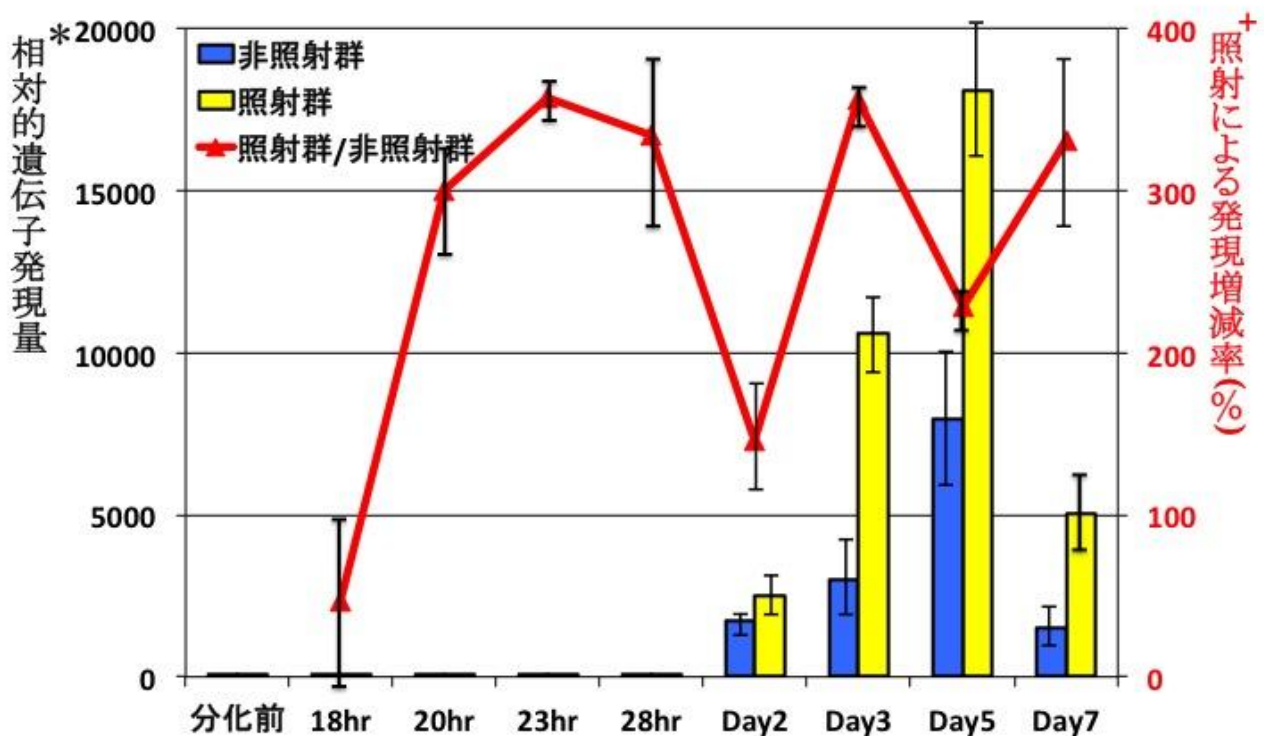


*分化誘導前の遺伝子発現量を1とする

+非照射群の遺伝子発現量を100としたときのLIPUS照射による発現率

図 11 MyoD の転写量 (LIPUS 非照射・照射群の相対的遺伝子発現量と LIPUS 照射による発現率)

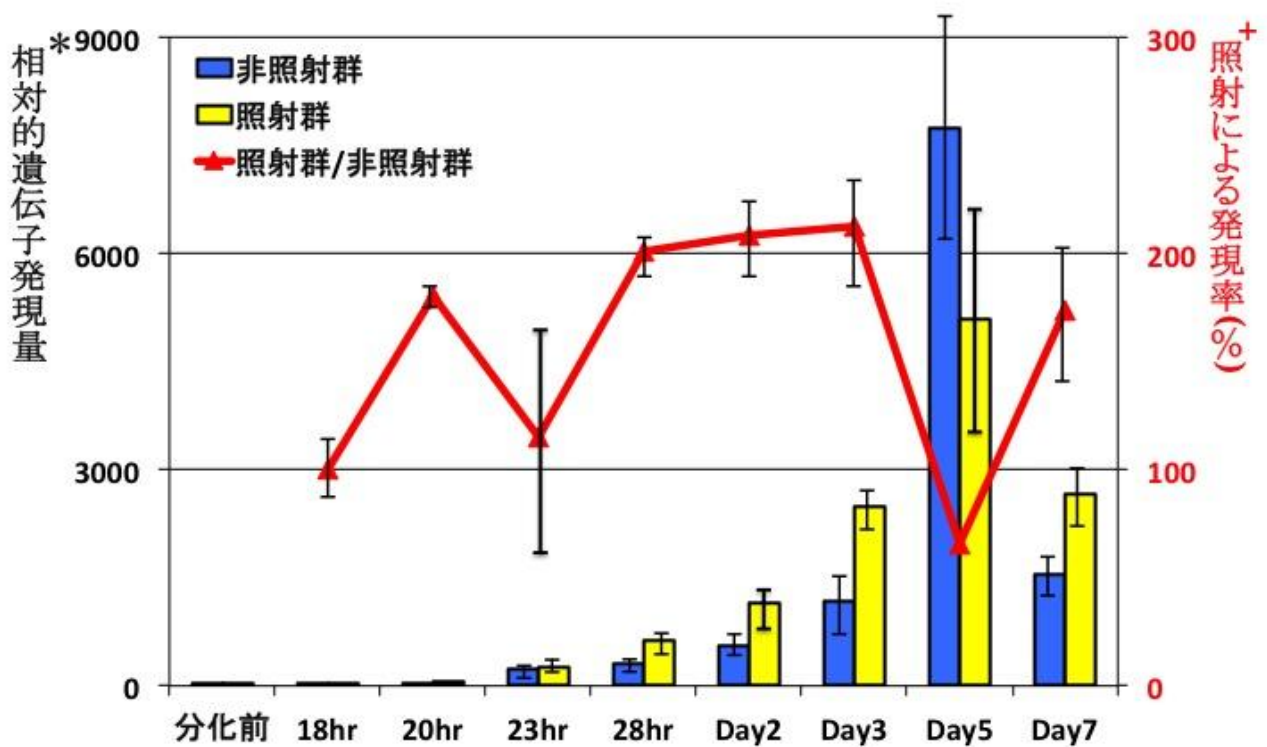
棒グラフは筋への分化誘導をした後の経時的な遺伝子発現の推移を、増殖状態の C2C12 細胞における遺伝子発現量を 1 とした時の相対量で表している。折れ線グラフは LIPUS を照射して分化を行っているサンプルの遺伝子発現量を、同時点での非照射サンプルにおける遺伝子発現量を 1 とした時の比 (百分率) で表している。



*分化誘導前の遺伝子発現量を1とする
 +非照射群の遺伝子発現量を100としたときのLIPUS照射による発現増減率

図 12 Myogenin の転写量 (LIPUS 非照射・照射群の相対的遺伝子発現量と LIPUS 照射による発現率)

棒グラフは筋への分化誘導をした後の経時的な遺伝子発現の推移を、増殖状態の C2C12 細胞における遺伝子発現量を 1 とした時の相対量で表している。折れ線グラフは LIPUS を照射して分化を行っているサンプルの遺伝子発現量を、同時点での非照射サンプルにおける遺伝子発現量を 1 とした時の比 (百分率) で表している。



*分化誘導前の遺伝子発現量を1とする
 +非照射群の遺伝子発現量を100としたときのLIPUS照射による発現率

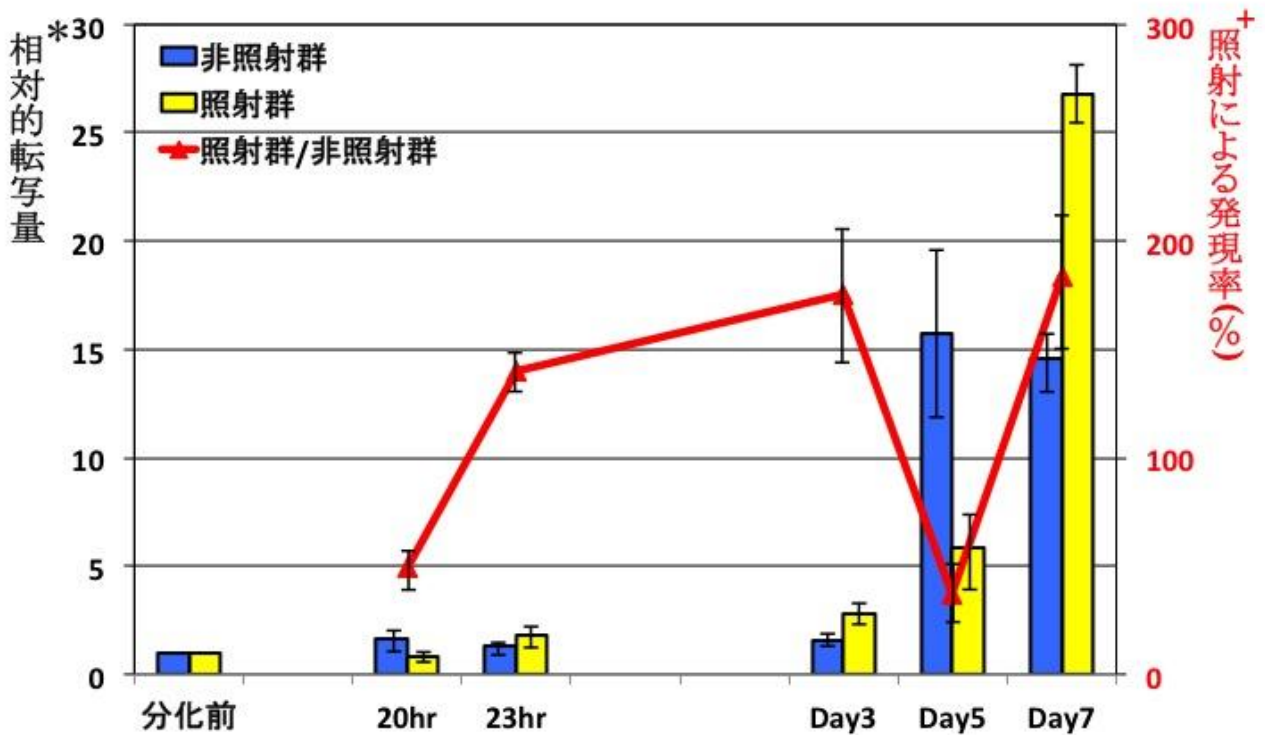
図 13 MCK の 転 写 量 (LIPUS 非 照 射 ・ 照 射 群 の 相 対 的 遺 伝 子 発 現 量 と LIPUS 照 射 に よ る 発 現 率)

棒グラフは筋への分化誘導をした後の経時的な遺伝子発現の推移を、増殖状態のC2C12細胞における遺伝子発現量を1とした時の相対量で表している。折れ線グラフはLIPUSを照射して分化を行っているサンプルの遺伝子発現量を、同時点での非照射サンプルにおける遺伝子発現量を1とした時の比(百分率)で表している。

4 . miRNA-499 は LIPUS 照射によって発現が促進された

筋細胞で発現していることが知られている miRNA のうち , miRNA-1b , miRNA-27a , miRNA-29b , miRNA-30a , miRNA-133a , miRNA-135b , miRNA-206 , miRNA-208b , miRNA-486a , miRNA-499 について筋分化中の発現量を調べた . これらのうち miRNA-499 以外については , LIPUS 照射による影響は認められなかった .

一方 , miRNA-499 の転写量は分化誘導 5 日後 (照射 4 日後) から分化誘導 7 日後 (照射 6 日後) にピークを迎え , 増殖状態の C2C12 細胞の 15 倍程度となった (図 14) . LIPUS の照射により , 分化誘導 7 日後 (照射 6 日後) にはこのピークがさらに約 1.7 倍増強された .



*分化誘導前のmiRNA転写量を1とする

+非照射群のmiRNA転写量を100としたときのLIPUS照射による発現率

図 14 miRNA-499 の転写量 (LIPUS 非照射・照射群の相対的 miRNA 転写量と LIPUS 照射による発現率)

棒グラフは筋への分化誘導をした後の経時的な miRNA 転写量の推移を、増殖状態の C2C12 細胞における miRNA 転写量を 1 とした時の相対量で表している。折れ線グラフは LIPUS を照射して分化を行っているサンプルの miRNA 転写量を、同時点での非照射サンプルにおける miRNA 転写量を 1 とした時の比 (百分率) で表している。

考 察

下出ら⁶⁾は筋芽細胞株 C2C12 の筋分化途中に LIPUS を照射すると、筋線維形成が促進されることを以前報告した。しかし、先行研究⁶⁾では形態の変化のみで分化の度合いを評価していたために定量化が困難であった。そこで、本研究では蛍光免疫染色法により筋特異的なタンパク質であるミオシン重鎖 (myosin heavy chain, MHC) を検出し、分化の指標とした。その結果、非照射群に比べて照射群では MHC 陽性の細胞が多数観察された (図 4)。また筋分化過程では、多数の筋芽細胞が融合し、長い多核の細胞が形成されるのも大きな特徴である。そこで、MHC 陽性細胞の長径を測定したところ、照射群の細胞の方が有意に長かった (図 5)。以上より LIPUS 照射によって、筋特異的なタンパク質の発現と細胞融合の両方が促進されていることが予想された。

Ikeda ら²⁴⁾は C2C12 細胞に周波数 1.5 MHz の LIPUS を照射し、照射 3 時間から 6 時間後に骨分化マーカーである Runx2, Msx2, AJ18, Dlx5 や軟骨分化マーカーである Sox9 の転写量が非照射群と比べ増加し、逆に筋肉の分化マーカーである MyoD の転写量が抑制されると報告している。これらの事実から彼らは、LIPUS 照射は C2C12 細胞を筋分化から骨分化や軟骨分化に変換させていると結論づけている。また、下出ら⁶⁾は以

前，分化誘導中の C2C12 細胞に LIPUS を照射すると，筋細胞分化に関係する転写因子である MyoD と骨形成誘導に関与する因子である BMP2 の転写が照射 1 時間後に増加し，照射 24 時間後には抑制されると報告した．そこで照射初期に上昇する BMP2 の遺伝子発現が，C2C12 細胞の分化方向性にどのような影響があるのかを調べるために分化誘導 7 日後（照射 6 日後）の細胞におけるカルシウム沈着の有無を von Kossa 染色法によって調べた．その結果，LIPUS 照射の有無に関わらず，C2C12 細胞ではカルシウムの沈着が無いことを確認した（図 6）．以上から LIPUS 照射 1 時間後に認められた BMP2 の一過性転写上昇は，C2C12 細胞の骨への分化を誘導するものではないと考えられた．

筋肉は収縮能を持つ線維状の多核細胞からなる．筋芽細胞が筋に分化するためには，各々の筋芽細胞で筋特異的な遺伝子が発現することと，単核の細胞がお互いに融合して線維状の多核細胞を形成することが重要である¹⁶⁾．そこで LIPUS による筋分化促進作用が，筋分化のどの段階を促進しているかを明らかにするために，これら 2 つに関連する遺伝子発現量を精査した．細胞融合に関するシグナル促進因子として ERK5，また転写活性因子として Klf2，これらの下流因子の 1 つとして細胞接着因子 Cdh15 を調べた．また筋特異的な遺伝子の転写活性因子として MyoD，Myogenin を，分化最終段階で発現される遺伝子の代表として MCK を

選んだ。

以上の遺伝子は図 15 のような経路で作用し合い、細胞は筋へと分化していく。LIPUS 照射により、ERK5 の転写量は分化誘導 23 時間後(照射 6 時間後)をピークとして著しく上昇した。LIPUS を照射すると ERK5 の発現は転写量のピーク時にさらに 1.7 倍程度増強された(図 8)。その下流で働く Klf2 の転写量は ERK5 と同様に分化誘導 23 時間後(照射 6 時間後)まで上昇を続け、その後少なくとも分化誘導 7 日後(照射 6 日後)までは比較的高いレベルを維持していた。LIPUS 照射により Klf2 の分化誘導 23 時間後(照射 6 時間後)の転写量のピークは、さらに 1.7 倍程度増強されていた(図 9)。Cdh15 の転写量は分化誘導 23 時間後(照射 6 時間後)から 28 時間後(照射 11 時間後)に約 10 倍近く上昇し、分化誘導 5 日後(照射 4 日後)までは高いレベルを維持していた。LIPUS 照射により分化誘導 23 時間後(照射 6 時間後)の転写量のピークはさらに 1.8 倍程度増強されていた。

ERK5 は Klf2 などの転写活性因子を介して筋細胞の融合を制御することが報告されている²⁵⁾。LIPUS 照射によって ERK5, Klf2, Cdh15 遺伝子の転写量が分化誘導 23 時間後(照射 6 時間後)にいずれも上昇していることから、LIPUS は筋細胞への分化過程において細胞融合を促進していると考えられる。また分化誘導 7 日後(照射 6 日後)には LIPUS 照射によって ERK5 と Cdh15

の転写量が再び増強されていることは、照射群の筋細胞の方がより多くの細胞が融合して長くなっていることと関連している可能性がある。

また、筋特異的な遺伝子である MyoD の転写量は分化誘導 23 時間後 (照射 6 時間後) から 28 時間後 (照射 11 時間後) をピークに約 3 倍近くまで上昇し、分化誘導 2 日後 (照射 1 日後) には一旦低下するが分化誘導 3 日後 (照射 2 日後) から分化誘導 7 日後 (照射 6 日後) までは再び上昇傾向にあった。LIPUS を照射すると MyoD の分化誘導 23 時間後 (照射 6 時間後) の発現量のピークがさらに 2.4 倍程度増強された。また、分化誘導 3 日後 (照射 2 日後) にも LIPUS による増強作用が認められた (図 11)。Myogenin の転写は分化誘導 2 日後 (照射 1 日後) から急激に上昇し始め、分化誘導 5 日後 (照射 4 日後) をピークとして約 8,000 倍まで増強した。LIPUS を照射すると、Myogenin 発現量は分化誘導 3 日後 (照射 2 日後) から分化誘導 7 日後 (照射 6 日後) にかけてさらに増強が観察された (図 12)。

筋分化過程では初期に MyoD の発現が、それよりやや遅れて Myogenin の発現が上昇することが知られている²⁶⁾。LIPUS 照射によって MyoD や Myogenin の発現が促進された時間は、各々の遺伝子発現がピークに達するタイムポイントとほぼ一致している。また照射群では MHC 陽性細胞の出現頻度が高いことが認められた (図 4)。以上より LIPUS 照射は筋特異的な遺伝子

の発現も促進していると考えられる。

筋分化の最終マーカーである MCK は筋肉中のクレアチンからクレアチンリン酸を作る酵素であり，筋肉が本来の働きをするために必須である．LIPUS 照射によって分化段階のより早期である分化誘導 28 時間（照射 11 時間後）から分化誘導 3 日後（照射 2 日後）に発現が増大していることは，筋として機能する細胞がより早く完成していることを示唆している（図 13）．

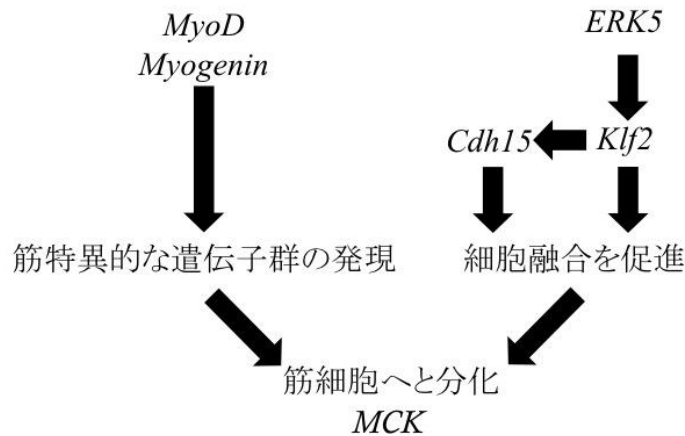


図 15 発現を解析した遺伝子の作用と筋への分化

筋形成過程では，いくつもの miRNA が関与していることが知られている²⁷⁻²⁹）。本研究では筋線維へ分化中の細胞における miRNA-1b, miRNA-27a, miRNA-29b, miRNA-30a, miRNA-133a, miRNA-135b, miRNA-206, miRNA-208b, miRNA-486a, miRNA-499 の発現量について LIPUS 照射群と非照射群で経時的に調べた．その結果，miRNA-499 以外の miRNA は LIPUS を照射して

も非照射群の細胞と比べて，発現に有意な差異は認められなかった．miRNA-499は筋の遅筋タイプのMHC遺伝子内にコードされており，骨格筋の遅筋化を負に制御するSox6(sex-determining region Y-box 6)を抑制することで筋の遅筋への分化抑制を解除している(表3)．これによりmiRNA-499は遅筋化を促進している³⁰⁾．本研究ではLIPUS照射により分化誘導7日後にmiRNA-499の発現量が約1.7倍促進されている．C2C12細胞は速筋と遅筋の両方に分化すると考えられているが²⁶⁾，LIPUS照射によって遅筋の割合が多くなっている可能性が示唆された．

結 論

LIPUS 照射が C2C12 細胞に与える影響について検討し、以下の結論を得た。

1. LIPUS 照射により C2C12 細胞の筋細胞への分化が促進された。
2. LIPUS 照射によって C2C12 細胞が骨細胞に分化することはなかった。
3. LIPUS 照射は、ERK5-Klf2-Cdh15 の経路を介して、筋分化過程における細胞融合を促進していた。
4. LIPUS 照射は、MyoD や Myogenin などの転写活性因子を介して、筋特異的なタンパク質の発現を促進していた。
5. LIPUS 照射によって、MCK の転写促進が分化段階の早期に見られたことから、より早く筋細胞が完成することが示唆された。
6. LIPUS 照射によって、miRNA-499 の発現増強がみられたことから、筋細胞の遅筋への分化が促進されていることが示唆された。

引用文献

- 1) Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004 ; 84 : 209-238
- 2) Weintrub H, Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Adams MA, Lassar AB and Miller AD. Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Dev Biol.* 1989 ; 86 : 5434-5438.
- 3) Molkenin JD and Olson EN. Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 ; 93 : 9366-9373.
- 4) Richardson BE, Nowak SJ and Baylies MK. Myoblast fusion in fly and vertebrates: new genes, new processes and new perspectives. *Traffic.* 2008 ; 9 : 1050-1059.
- 5) Sunadome K, Yamamoto T, Ebisuya M, Kondoh K, Sehara-Fujisawa and Nishida E. ERK5 regulates muscle cell fusion through Klf2 transcription factors. *Dev Cell.* 2011 ; 20 : 192-205.
- 6) 下出 輝 , 梶本忠保 , 山添光芳 , 堀田正人 . 低出力超音波パルス (low-intensity pulsed ultrasound) のマウス筋芽細胞の分化に対する影響の検討 . 日口腔インプラント誌 . 第28巻投稿中 .

- 7) Khanna A, Nelmes RT, Gougoulis N, Maffulli N and Gray J. The effect of LIPUS on soft-tissue healing : a review of literature. *Br Med Bull.* 2009 ; 89 : 169-182.
- 8) Croce CM and Calin GA. miRNAs, cancer, and stem cell division. *Cell.* 2005 ; 6 : 6-7.
- 9) Chen K and Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nature Rev Genet.* 2007; 8: 93-103.
- 10) Zhao Y and Srivastava D. A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci.* 2007;32: 189-197.
- 11) Hamilton AJ and Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science.* 1999; 286: 950-952.
- 12) Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR and Ruvkun G. The 21- nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000; 403: 901-906.
- 13) Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell.* 2004; 116: 281-297.
- 14) Stefani G and Slack FJ. Small noncoding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9: 219-230.

- 15) McCarthy JJ and Esser KA. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol*. 2007; 102: 306-313.
- 16) Callis TE, Deng Z, Chen JF and Wang DZ. Muscling through the microRNA world. *Exp Biol Med*. 2008; 233: 131-138.
- 17) van Rooij E, Liu N and Olson EN. MicroRNAs flex their muscles. *Trends Genet*. 2008; 24 : 159-166.
- 18) van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Kelm RJ Jr and Olson EN. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell*. 2009; 17: 662-673.
- 19) Small EM, O'Rourke JR, Moresi V, Sutherland LB, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA and Olson EN. Regulation of PI3-kinase/Akt signaling by muscle-enriched microRNA-486. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 4218-4223.
- 20) Liu N, Williams AH, Kim Y, McAnally J, Bezprozvannaya S, Sutherland LB, Richardson JA, Bassel-Duby R and Olson EN. An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104 : 20844-20849.

- 21) Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, Tsuchihashi T, McManus MT, Schwartz RJ and Srivastava D. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*. 2007; 129 : 303-317.
- 22) Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, Baskerville S and Lodish HF. Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103: 8721-8726.
- 23) Rosenberg MI, Georges SA, Asawachaicharn A, Anala E and Tapscott SJ. MyoD inhibits Fstll and Utrn expression by inducing transcription of miR-206. *J Cell Biol*. 2006; 175: 77-85.
- 24) Ikeda K, Takayama T, Suzuki N, Shimada K, Otuka K and Ito K. Effect of low-intensity ultrasound on the differentiation of C2C12 cells. *Life Sci*. 2006;79:1936-1943.
- 25) Sunadome K, Yamamoto T, Ebisuya M, Kondoh K, Sehara-Fujisawa and Nishida E. ERK5 regulates muscle cell fusion through Klf transcription factors. *Dev Cell*. 2011;20:192-205.
- 26) Du C, Jin YQ, Qi JJ, Ji ZX, Li SY, An GS, Jia HT and Ni JH. Effects of Myogenin on expression of late muscle genes through MyoD-dependent chromatin

- remodeling ability of Myogenin. *Mol Cells*. 2012; 34: 133-142.
- 27) Chen JF, Callis TE and Wang DZ. microRNAs and muscle disorders. *J Cell Sci*. 2009;122:13-20.
- 28) Liu N and Olson EN. MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development. *Dev Cell*. 2010;18:510-525.
- 29) Kim HK, Lee YS, Sivaprasad U, Malhotra A and Dutta A. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *J Cell Biol*. 2006;174:677-687.
- 30) Quiat D, Voelker KA, Pei J, Grishin NV, Grange RW, Bassel-Duby R and Olson EN. Concerted regulation of myofiber-specific gene expression and muscle performance by the transcriptional repressor Sox6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108: 10196-10201.

