

主 論 文

電気刺激が培養筋芽細胞の分化に与える影響

保健学研究科 心身機能生活制御科学講座

生体環境適応科学研究室

河原 裕美

目次

略語	3
第1章 緒言	5
第2章 電気刺激による培養筋芽細胞の分化への影響	11
第1節 目的	11
第2節 方法	11
第1項 実験条件	11
第2項 形態学的観察	12
第3項 分子細胞生物学的解析	13
第4項 統計学的解析	15
第3節 結果	16
第1項 電気刺激条件の設定	16
第2項 経時的な形態変化	18
第3項 筋分化マーカーのmRNA発現	23
第4項 筋分化マーカーのタンパク質発現	24
第4節 考察	26
第1項 電気刺激条件	26
第2項 電気刺激による筋分化促進	27
第5節 まとめ	29
第3章 電気刺激による培養筋芽細胞の筋収縮への影響	30
第1節 目的	30
第2節 方法	30
第1項 実験条件	30
第2項 電気生理学的解析	30
第3項 分子細胞生物学的解析	31
第4項 統計学的解析	32
第3節 結果	33
第1項 活動電位の計測	33
第2項 筋分化メカニズムに関与するタンパク質発現	34
第3項 カルシウムチャネル関連タンパク質発現	35
第4節 考察	37

第1項	電気刺激による筋分化促進メカニズム	37
第2項	電気刺激による筋収縮メカニズム	40
第5節	まとめ	41
<hr/>		
第4章	考察	42
第1節	電気刺激療法の効果	42
第2節	筋分化促進と細胞接着因子	43
第3節	電気刺激の筋再生医療への応用	47
第4節	意義と今後の課題	49
<hr/>		
第5章	結論	50
<hr/>		
	謝辞	51
<hr/>		
	学位論文の基礎となる原著	52
<hr/>		
	引用文献	53
<hr/>		

略語

本論文で用いられている略語は、以下の通りである。

ANOVA	: analysis of variance	分散分析
BSA	: bovine serum albumin	ウシ血清アルブミン
cDNA	: complementary DNA	相補的 DNA
Cx43	: connexin43	コネキシン 43
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle medium	ダルベッコズ モディファイドイーグル培地
DNA	: deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
EBM	: evidence based medicine	証拠に基づいた医療
FBS	: fetal bovine serum	ウシ胎児血清
GJIC	: gap junctional intercellular communication	ギャップ結合を介した細胞間コミュニケーション
g3pdh	: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	グリセロアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素
HEPES	: 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid	4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-エタン硫酸
HRP	: horseradish peroxidase	西洋ワサビペルオキシダーゼ
IGF-I	: insulin-like growth factor I	インスリン様成長因子 I
IgG	: immunoglobulin G	免疫グロブリン G
MAPK	: mitogen-activated protein kinase	分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ
mRNA	: messenger RNA	メッセンジャーRNA
MRF-4	: myogenic regulatory factor 4	筋原性制御因子 4
MSCs	: mesenchymal stem cells	間葉系幹細胞
myf-5	: myogenic factor 5	筋原性因子 5
myf-6	: myogenic factor 6	筋原性因子 6
PBS	: phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
PI	: propidium iodide	プロピジウム アイオダイド
RNA	: ribonucleic acid	リボ核酸
RT-PCR	: reverse transcription-polymerase chain reaction	逆転写・ポリメラーゼ連鎖反応
SD	: standard deviation	標準偏差

SDS-PAGE	: sodium dodecyl sulfate· polyacrylamide gel electrophoresis	ドデシル硫酸ナトリウム・ポリ アクリルアミドゲル電気泳動
TBS	: Tris-buffered saline	トリス緩衝生理食塩水
TBS-T	: Tris-buffered saline · Tween20	Tween20 を含む TBS
Tris	: tris hydroxymethyl amino methane	トリス ヒドロキシメチル ア ミノメタン
Tris-HCl	: trishydroxy methyl amino methane · hydrochloric acid	トリス塩酸緩衝液

第1章 緒言

脊椎動物の骨格筋は、主に中胚葉に由来し、特に、体幹筋および四肢筋の細胞は、すべて体節中の筋節由来である。哺乳類の中胚葉は、分化の全能性をもつ原始外胚葉と原始内胚葉との相互作用により、原始外胚葉から生じ、中軸構造の脊索とともに沿軸中胚葉を形成する。沿軸中胚葉は、初期では分節の認められない一続きの細胞集団であるが、発生に伴い分節した体節となる。体節は、形成直後には均一な上皮様の細胞集団であるが、やがて領域化が起こる。まず、腹内側から脊椎骨となる硬節を生じ、残った上皮様の細胞は、さらに背側の皮節と筋節に分かれる。筋節内に生じた骨格筋系譜の細胞は、一部は早期に分化するが、その多くは骨格筋前駆細胞（筋芽細胞）として増殖を繰り返してその数を増やし、将来の体幹筋をつくる。一方、四肢の骨格筋は、筋節外腹側から遊離した細胞が四肢の発生部位である肢芽に遊走し、筋前駆細胞となって形成される。

細胞レベルでは、骨格筋線維は以下の段階を経て形成されると考えられる。

- ① 体節内で中胚葉多能性細胞から決定により筋芽細胞を生じる。
- ② 筋芽細胞がしかるべき領域に移動し、しかるべき数に増殖する。
- ③ 筋芽細胞が増殖を停止して分化し、多核の筋管細胞を形成する。
- ④ 筋管細胞がさらに成熟し、筋線維となる。

筋発生における中胚葉多能性細胞を筋細胞系譜へ誘導し、筋特異的タンパク質の転写を制御する因子（MyoD, myf-5, myogenin, MRF-4 (myf-6 別名 herculin)）を総称して、筋分化制御因子 MyoD ファミリーとよぶ。骨格筋の決定、増殖、分化の過程における MyoD ファミリーの転写調節ネットワークを図 1 に示す。中胚葉多能性細胞から筋芽細胞への決定には、MyoD または myf-5 の少なくとも一方の発現が必須であり、筋芽細胞の増殖にも関与する。筋芽細胞が増殖を停止し分化段階に入ると

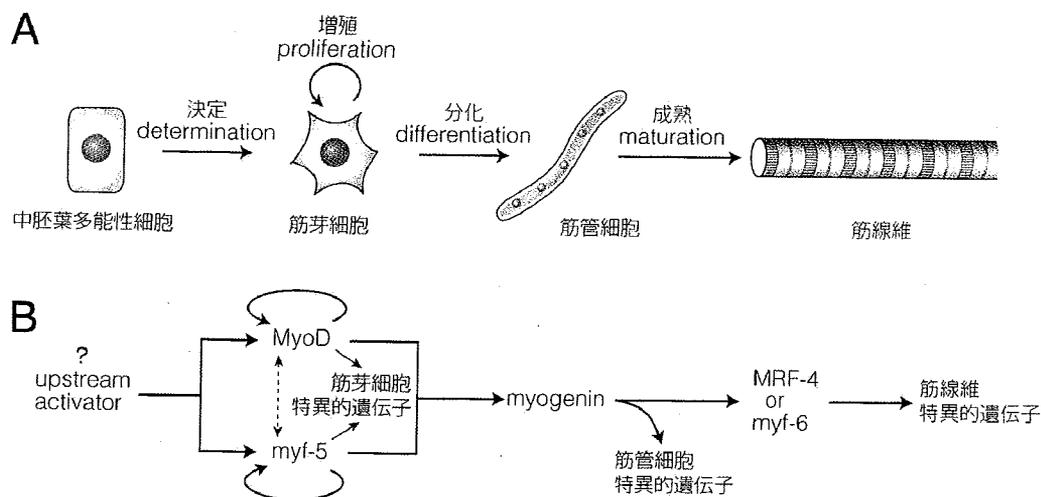


図1 骨格筋細胞の発達段階(A)と MyoD ファミリーの分化制御ネットワーク(B)

A: 中胚葉多能性細胞は、体節内で骨格筋系譜に「決定」され、筋芽細胞となる。筋芽細胞は「増殖」を繰り返して数を増した後、増殖を止め「分化」し、筋管細胞を形成する。筋管細胞は筋線維へと「成熟」する。

B: 中胚葉多能性細胞からの「決定」または筋芽細胞の維持は、MyoD あるいは myf-5 が担い、筋管細胞への「分化」は myogenin が担っている。「成熟」には、MRF-4 (myf-6) が働いている。これらの因子は、互いに発現調整を行い図のようなネットワークを形成している (→ は転写活性を表す)。「分化」のステップは、正常な筋発生では不可逆的であり、MyoD あるいは myf-5 による発現が myogenin を活性化する。MyoD と myf-5 の相互関係は、現在のところ決着がつかっていない。また、MyoD ファミリーの発現を最初に引き起こす因子 (upstream activator およびこれを誘導する因子) も解明されていない。(吉田松生, 他: 細胞工学 14, 1995 より改変¹⁾)

myogenin の発現が誘導され、筋芽細胞は筋管細胞へ分化する。MRF-4 (myf-6) は、筋細胞分化後期に発現し、筋管細胞の成熟や筋線維の形成を促す¹⁾。

筋の治癒過程は、発生の過程と類似する点がみられる (図2)。骨格筋細胞は、主に筋衛星細胞によって組織を再生する。受傷した筋は、マクロファージなどの貪食細胞の浸潤が起こった後に筋衛星細胞の活性化が起こり、筋芽細胞の増殖がみられるようになる。筋損傷後 24 時間後には、筋芽細胞の増殖に関連する MyoD の発現がみられる。筋衛星細胞は、受傷後 2~3 日すると筋壊死部にみられるようになる。受

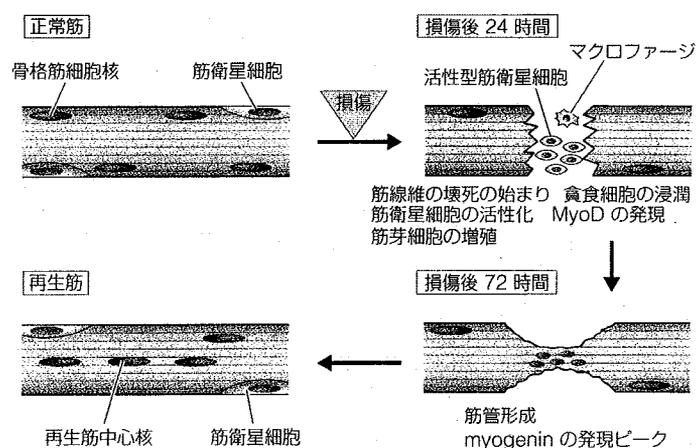


図 2 骨格筋の再生過程

骨格筋線維が損傷を受けると、損傷 24 時間後にマクロファージが浸潤し、筋衛星細胞が活性化し増殖する。この時期に MyoD が強く発現する。72 時間後には、myogenin が発現のピークを迎え、筋管細胞が形成される。その後、再生筋線維に中心核が認められ、筋管細胞はさらに分化成熟し、中心にあった核が辺縁部に移動して再生が終わる。(武田伸一, 他: Bio Clinica 15, 2000 より改変²⁾)

傷後 72 時間経過すると、筋細胞のように細長い細胞で中心部にたくさんの核が一行に並んだ細胞（筋管細胞）が出現し、このとき myogenin の発現がピークとなる。再生筋線維は、横断で見ると核が細胞の中心にあることから中心核線維、縦断で見ると核が鎖のようにつながって見えることから核鎖線維とよばれる²⁾。

筋衛星細胞は、未分化な細胞であり、前述のように必要に応じて増殖・分化して筋を再生する。筋衛星細胞は、正常の筋でも筋線維の基底膜と形質膜との間に存在しているが、活動はしておらず、マクロファージが産生するサイトカイン（線維芽細胞成長因子等）の刺激が加わった場合に、活性型の筋衛星細胞になる。活性型の筋衛星細胞は、分裂増殖して壊死部を埋めつくした後、互いに融合して多核の細胞になり、細胞質のなかに筋原線維が発現する。筋再生が終わると、活性型筋衛星細胞は、次の再生のために一部が不活性型の筋衛星細胞として、再び筋線維の辺縁部に移動する²⁾。

一般に、細胞の増殖や分化は、ホルモンや成長因子、サイトカイン等の液性因子と

細胞表面に存在する特異的受容体との結合により活性化される細胞内シグナル伝達によって調節されている³⁾。筋細胞でも、液性因子の刺激によるシグナル伝達を介して MyoD ファミリーの発現が誘導され、増殖や分化が制御されている^{2,5)}。筋再生の際には、マクロファージが産生するサイトカインの刺激によって、MyoD の発現が誘発される²⁾。また、インスリン様成長因子 I (insulin-like growth factor I: IGF-I) による刺激も、MyoD や myf-5 の発現を誘発することが知られている^{4,5)}。

筋細胞の分化には、液性因子の刺激だけでなく、細胞を取り巻く環境からの物理的刺激も重要である。筋細胞において、外部からの物理的刺激は、遺伝子レベルで何らかの影響を及ぼし、その動態を制御していることが示されている⁶⁻¹⁶⁾。Yuge ら⁶⁾は、細胞質内に磁性微小粒子を取り込ませた筋芽細胞に、磁石を使って伸張刺激を加えると、細胞の分化が促進されることを報告している。シリコン膜に播種した筋芽細胞に電動モーターで伸張刺激を与えた研究からも、伸張刺激によりミオシン重鎖の発現が誘導され、筋芽細胞の分化を促進することが示されている^{7,8)}。また、模擬微小重力環境で筋芽細胞を培養した実験からは、重力という負荷が減少すると、細胞内シグナル伝達を介して筋の分化が抑制されることが報告されている⁹⁾。

筋分化過程は、細胞接着分子である β_1 -インテグリンや M-カドヘリンを介したシグナル伝達によっても調節されている¹⁷⁻²⁴⁾。インテグリンは、遺伝子発現、細胞の増殖や分化、細胞死など多くの細胞現象に関与しており^{17,25-28)}、細胞外マトリックス (コラーゲンやプロテオグリカンなど、正常細胞の成長・分裂に必要な他の細胞や基質への接着を仲立ちするタンパク質) と細胞骨格を連結する役割を担っている (図 3-A,B)。カドヘリンは、細胞と細胞の接着と維持の役割を担っており、細胞膜で β -カテニンと複合体を形成し (図 3-A,C)、この β -カテニンを介して細胞骨格と連結されているため、インテグリンと同様に細胞外からの刺激を細胞内に伝達することができる²⁵⁾。これら細胞接着分子が刺激を感知すると、液性因子とその受容体との反応と同様に、細

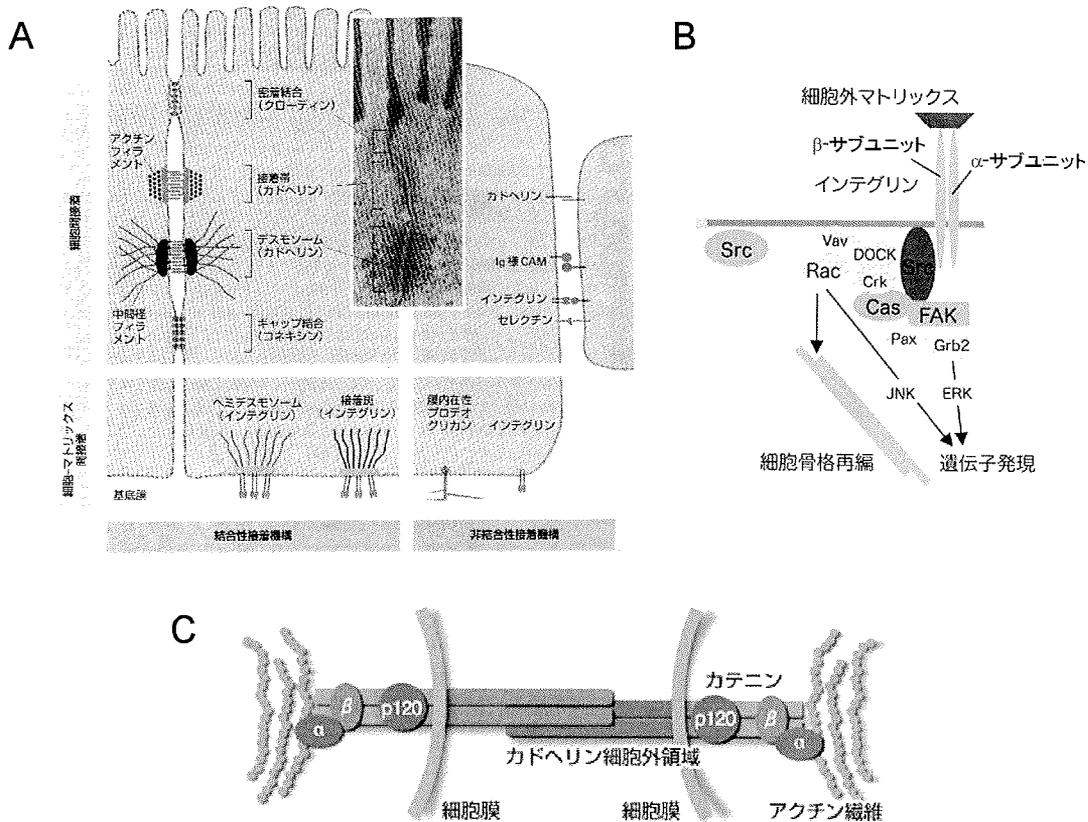


図3 細胞接着因子(A)²⁸⁾とインテグリン(B)²⁹⁾およびカドヘリン(C)³⁰⁾の模式図

細胞接着因子は様々ある。主に細胞接着には、インテグリンとカドヘリンが関与しており、ともに細胞骨格と連結している。

胞内シグナル伝達 (MAPK カスケードやカルモジュリン経路等) が活性化される²⁵⁾ ことから、物理的刺激によって細胞応答が調節されていることが分かる。

さらに、さまざまな組織を形成する胚の発達には、ギャップ結合を介した細胞間コミュニケーション (gap junctional intercellular communication: GJIC) が関与している^{28,31)}。ギャップ結合は、コネクシン (connexin: Cx) の六量体であるコネクソンが連結した細胞接着装置で、カルシウムイオンなど分子量 1,000 以下の低分子を細胞間でやり取りする機能がある²⁸⁾。GJIC は、骨格筋細胞の分化において、MyoD ファミリーの発現調節に関与していることが知られており³¹⁻³³⁾、筋芽細胞の GJIC を阻害

すると myogenin と MRF-4 (myf-6) の発現が抑制される³³⁾。

物理的刺激の一つである電気刺激を用いた治療方法は、臨床応用されており、大きく治療的電気刺激、経皮的電気神経刺激、機械的電気刺激の3つに分類できる。長期臥床による廃用性症候群や宇宙飛行士にみられる宇宙適応症候群は、骨・関節系、呼吸・循環系、神経系など身体のあらゆる機能の障害として現れ、なかでも筋萎縮とそれに伴う筋力の低下は、その後の機能回復や予後に悪影響を及ぼす。治療的電気刺激は、主に筋萎縮の予防・改善や筋力増強を目的に行われているが、この電気刺激療法の効果を筋細胞レベルで検討した報告は少ない。その理由として、*in vivo* の研究¹¹⁻¹³⁾では神経系などの影響もあり筋細胞のみに対する電気刺激の影響を判定することが難しいと考えられる。一方、*in vitro* の研究¹⁴⁻¹⁶⁾では、持続的な電気刺激によりミオシンの発現変化が起こること¹⁴⁾、筋芽細胞が増殖すること^{15,16)}が報告されているが、これらの研究の実験期間を通して長時間電気刺激を持続するという刺激条件は、強度の強い刺激であると考えられる。したがって、そこで得られた知見は、電気刺激が筋細胞に何らかの影響を与える可能性を示唆するものの、電気刺激療法の治療効果を反映するものとはいえず、加えて、そのメカニズムも不明である。

そこで本研究では、まず、臨床に近い電気刺激効果を培養細胞で検討するため、新たな電気刺激の手法を独自に開発した。そして、この電気刺激システムを用いてラット骨格筋由来の筋芽細胞の培養中に電気刺激を施行し、筋の分化に与える影響について、形態学的、電気生理学的、分子細胞生物学的な側面から検討した。

第2章 電気刺激による培養筋芽細胞の分化への影響

第1節 目的

ラット骨格筋由来の筋芽細胞を培養した。培養中に電気刺激をした群（電気刺激群）と電気刺激をせず通常培養した群（対照群）とを比較し、培養筋芽細胞の分化に対する電気刺激効果について検討した。

第2節 方法

第1項 実験条件

ラット骨格筋由来の筋芽細胞（L6 細胞株）（IFO 50364: Health Science Research Resources Bank, Osaka, Japan）を培養した。増殖培地は、high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, USA) に10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) (Sigma-Aldrich Co.), 100 U/ml ペニシリン (Sigma-Aldrich Co.), 100 µg/ml ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich Co.) を添加して使用した。2.5 x 10⁵ 個の細胞を 90-mm 培養皿 (NUNC A/S, Roskilde, Denmark) に播種し、5% CO₂, 95% air, 37°Cの環境下で培養した。

培養6日後に細胞がコンフルエントとなったことを確認した後、分化誘導培地に交換した。分化誘導培地は、FBSも抗生物質も含まない high-glucose DMEM とした。

刺激電極は、シリコン素材の電極台の中に白金線を通して作成した。刺激には、電気刺激装置 SEN-2201 (Nihon Kodan Co., Tokyo, Japan) を使用し、培養6日、8日、10日、12日後の計4回実施した（電気刺激群）。刺激は、電気刺激装置につないだ白金線を培養液に浸した状態で行い（図4）、刺激条件は、矩形波、刺激頻度：0.5 Hz、

持続時間：2.0 msec，電圧：50 V，刺激時間：1日1回5分間とした。なお，本刺激条件は，矩形波，刺激頻度：0.2～1.0 Hz，持続時間：1.0～3.0 msec，電圧：10～100 V，刺激時間：1～10分/日という条件を様々組み合わせ，刺激条件選定の予備実験を行い，最適と考えた条件に設定した。対照群は，電気刺激を行わず，通常培養したものとした。

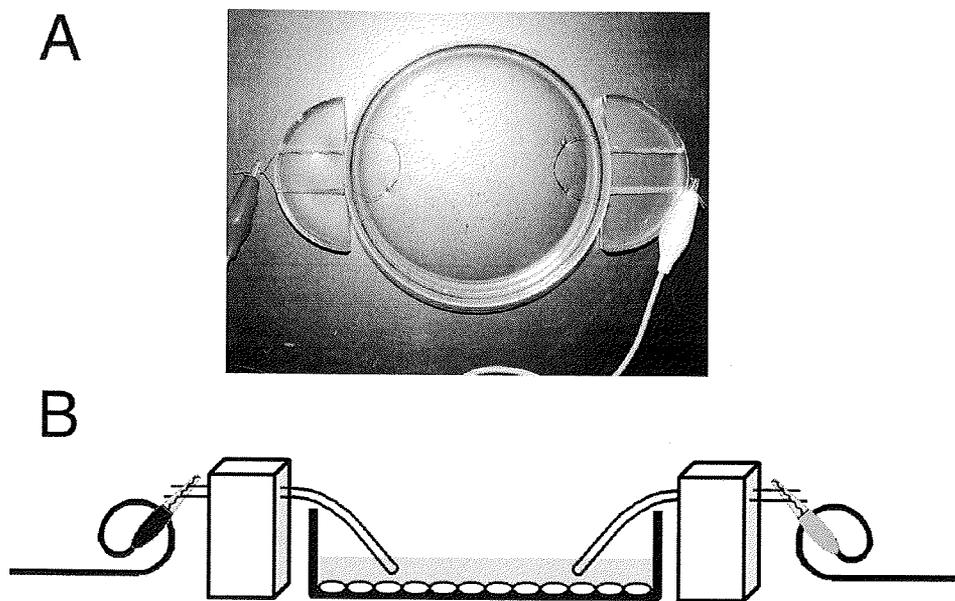


図4 培養筋芽細胞への電気刺激システム

電極となる白金線が直接細胞に触れない状態で，培養皿の両側から白金線を培養液に浸した。白金線は，電気刺激装置につながっている。(A) 本システムを上からみた写真。(B) 本システムを横からみた概略図。

第2項 形態学的観察

倒立型位相差顕微鏡 (TE300 Eclipse: Nikon Co., Tokyo, Japan) を用いて，細胞の形態変化を経時的に観察した。同時に，無作為に写真撮影 (0.50 cm x 0.75 cm) を行い (n=50)，単位面積あたりの筋管細胞の発生数と筋管細胞の最大横径を計測した。最大横径の計測には，NIH Image 1.62 (National Institute of Health, Bethesda,

Maryland, USA) を使用した。

第 3 項 分子細胞生物学的解析

1) RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 法

ISOGEN (NIPPON GENE Co., Ltd., Toyama, Japan) にて培養細胞を回収し、付属のプロトコールに従って RNA を抽出した。濃度測定後、SuperScript™ II (Invitrogen Co., Carlsbad, California, USA) を使用して逆転写反応を行った。作成した cDNA を鋳型とし、BD Advantage™ 2 PCR Kits (BD Bioscience Clontech, Palo Alto, California, USA) を使用して PCR を行い、筋分化マーカーの mRNA 発現を解析した。PCR に使用したプライマー (いずれも Sigma-Aldrich Japan K.K., Sigma Genosys, Hokkaido, Japan) と条件を表 1 に示す。なお、逆転写反応および PCR には、GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) を使用した。

表 1 PCR に使用したプライマーと条件

myogenin (NM_017115) product size: 450 bp	forward 5'-GTG AAT GAG GCC TTC GAG GCT CTG-3'	95°C- 30 sec 60°C- 45 sec
	reverse 5'-GCA GAA GTG GTG GCG TCT GAC AC -3'	68°C- 60 sec ----- 38 cycles
myf-6 (M27151) product size: 273 bp	forward 5'-TCA ACT ACA TTG AGC GTC TGC AGG-3'	95°C- 30 sec 68°C- 90 sec
	reverse 5'-CTG AGG AAA TAC TGT CCA CGA TGG-3'	----- 33 cycles
g3pdh (NM_017008) product size: 262 bp	forward 5'-TCT TCA CCA CCA TGG AGA AGG CTG-3'	95°C- 30 sec 60°C- 45 sec
	reverse 5'-ACA GTC TTC TGA GTG GCA GTG ATG-3'	68°C- 60 sec ----- 23 cycles

2) Western blot 法

2 x サンプリングバッファー (125mM Tris-HCl (pH 6.8), 20% グリセロール, 2% ドデシル硫酸ナトリウム, 4% 2-メルカプトエタノール, 0.02% ブロモフェノール・ブルー) にて培養細胞を回収し, 5 分間, 加熱変性させて試料を調整した. 濃度測定には, Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA) を用い, 検量線は, γ -グロブリン (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を使用して作成した. 12.5%ポリアクリルアミド・ゲルにて SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate · polyacrylamide gel electrophoresis) を行った. 1 レーン当たりのタンパク質量が, 10 μ g になるように試料をアプライし, 20 mA の定電流で約 2 時間, 電気泳動を行った後, ゲル中のタンパク質をニトロセルロース膜 (HybondTM-ECL: Amersham Biosciences UK Ltd., Buckinghamshire, England) に転写した. 2% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA) (Sigma-Aldrich Co.) を含む 0.1% Tween 20 入り Tris-buffered saline (TBS-T) にて 4°C で一晩ブロッキングした後, 一次抗体と 4°C で一晩反応させた. 使用した一次抗体と希釈倍率は, 以下の通りである. 抗 MyoD 抗体 (sc-760: Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA) (1:1,000), 抗 myf-5 抗体 (sc-302: Santa Cruz Biotechnology Inc.) (1:1,000), 抗 myogenin 抗体 (sc-576: Santa Cruz Biotechnology Inc.) (1:1,000), 抗 myf-6 抗体 (MRF-4 別名 herculin) (sc-301: Santa Cruz Biotechnology Inc.) (1:1,000), 抗 M-カドヘリン抗体 (611101: BD Biosciences Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey, USA) (1:1,000). 内部標準タンパク質には, 抗 β -アクチン抗体 (心筋や骨格筋とは反応しない) (A5441: Sigma-Aldrich Co.) (1:1,000) を用いた. 二次抗体には西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase: HRP) 標識抗マウス IgG 抗体または抗ラビット IgG 抗体 (いずれも Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, Massachusetts, USA) (1:10,000) を使用し, 室温にて 1 時間反応させ

た。 LumiGLO® reagent (Cell Signaling Technology, Inc.) と反応させ、 X 線フィルム (Hyperfilm™ ECL: Amersham Biosciences UK Ltd.) に露光して現像した。

第 4 項 統計学的解析

数値は、平均±標準偏差 (standard deviation: SD) で表した。統計解析は、StatView Ver. 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) を用いて行い、二元配置分散分析 (two-way analysis of variance: two-way ANOVA) および post hoc test (Scheffe 法) の結果、0.05 未満を有意水準とした。

第3節 結果

第1項 電気刺激条件の設定

電気刺激条件設定のため、刺激頻度、持続時間、電圧、刺激時間を様々組み合わせ（第2節 第1項 実験条件を参照）、予備実験を行った。

培養15日後の位相差顕微鏡像（図5-A）と形成された筋管細胞の分化、成熟の程度を検討するため、筋分化の最終マーカーである myf-6 のタンパク質発現を解析した結果（図5-B）の代表例を示す。

電気刺激をせず通常の分化誘導を行った条件①は、筋管細胞が形成され、myf-6 も発現した。

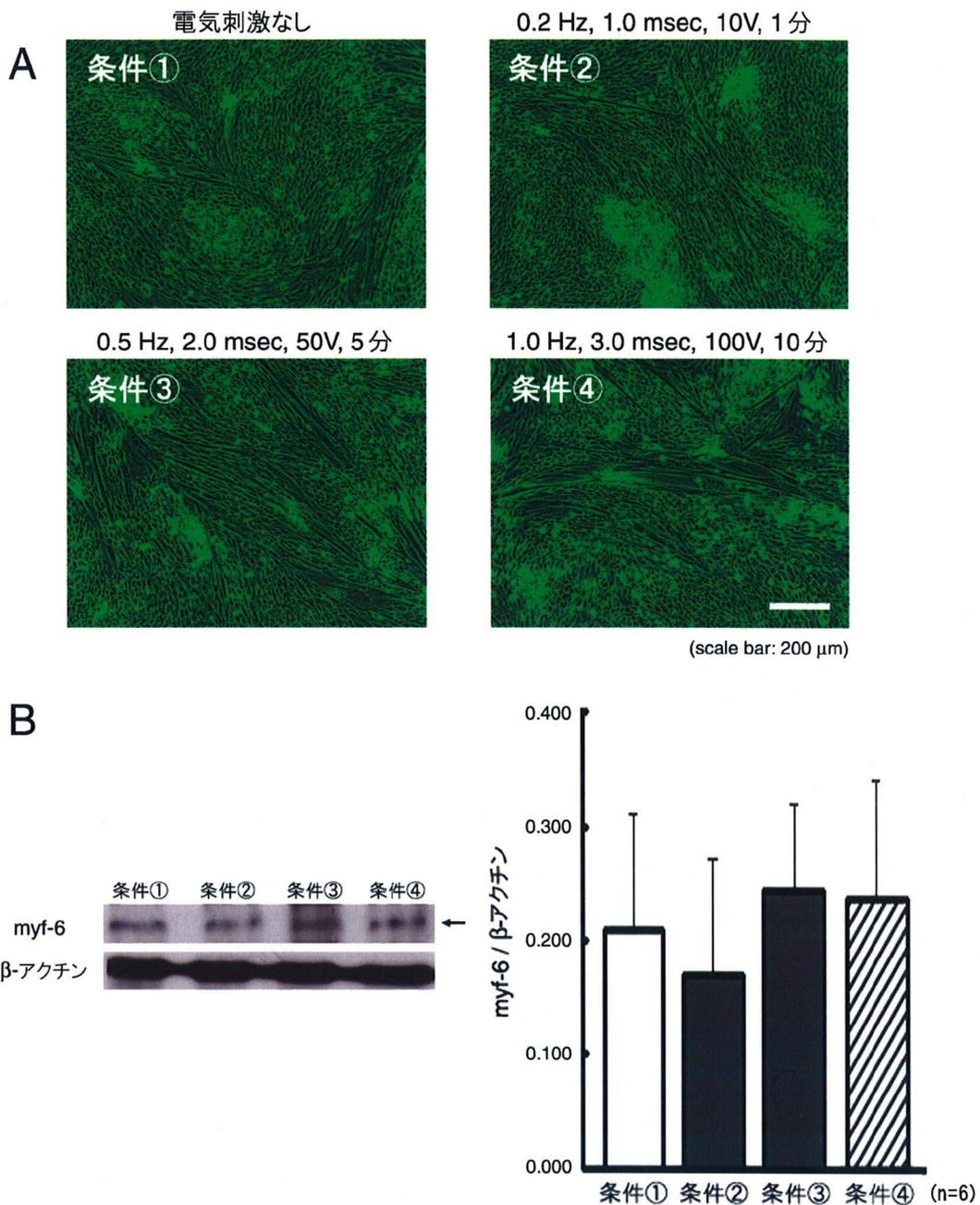
条件②は、筋管細胞の発生数や太さが条件①と変わらなかった。myf-6 の発現は、条件①と比較して減少する傾向がみられた。

条件③では、条件①および②と比較して、筋管細胞の発生数が多く、その太さも太かった。myf-6 の発現も、増加する傾向がみられた。

条件④は、条件③と同様に、条件①や②と比較して、筋管細胞の発生数が増加したが、培養途中で細胞が培養皿から剥離して、接着性細胞である L6 細胞株が浮遊し、死んだ細胞が多く観察された。また、電気刺激中、電極（培地に浸かった白金線）周囲では培地が変色し、正常な培地（pH=7.2）に比べて酸性（pH=6 付近）に傾いた状態になった。myf-6 の発現も条件③と同様に、条件①や②と比較して増加する傾向がみられたが、条件③と比較するとやや弱かった。

全ての条件を観察した結果、筋管細胞の方向性は、電極の極性に関係なく無秩序であった。

以上、複数の電気刺激条件について、形態観察および筋分化マーカーの発現を検討した結果、電気刺激により筋の分化促進される可能性が示唆された。その中でも、条件③に最も培養筋芽細胞に対する電気刺激効果がみられたので、この条件を採用することとした。



**図5 予備実験における位相差顕微鏡像(A)と筋分化マーカーのタンパク質発現(B)
(培養15日後)**

予備実験として行った電気刺激条件の結果の一部を示す。通常培養の場合(条件①)と比較し、刺激が弱い(条件②)と筋管細胞の発生数に差がみられず、myf-6の発現は減少傾向であった。条件③と④では、太い筋管細胞が形成され、myf-6の発現も条件①と比較して増加傾向であった。しかし、刺激が強い(条件④)と細胞が剥がれやすかった。

第 2 項 経時的な形態変化

筋芽細胞は、培養 1 日後に紡錘形の形態を示した (図 6-A)。培養 3 日後は、細胞はコロニーを形成し、培養 5 日後には、筋芽細胞同士の細胞融合が始まり、核を 2~3 個有する小さな筋管細胞も認められた (図 6-B)。培養 6 日目に最初の電気刺激を行った。培養 7 日後には、対照群では核が連珠状に一直列に並んだ帯状の筋管細胞がみられた (図 6-C)。電気刺激群では、核が二列で対照群よりも太い筋管細胞が出現した (図 6-D)。培養 10 日後は、対照群でも核が二列に並んだ筋管細胞がみられ (図 6-E)、電気刺激群では、核を三列以上持つ太い筋管細胞が認められた (図 6-F)。培養 12 日後は、対照群でも太い筋管細胞が出現し (図 6-G)、電気刺激群では、核を四列以上持つ発達したより太い筋管細胞が認められた (図 6-H)。培養 14 日後は、対照群でも発達した筋管細胞がみられ (図 6-I)、電気刺激群では七列以上の核の段を有する発達したより太い筋管細胞が認められた (図 6-J)。また、水アメ状の塊も形成され、さらに発達した筋管細胞もみられた。

単位面積当たりの筋管細胞の発生数は、対照群では培養 7 日以降増加し、培養 14 日後に最大となった (図 7)。電気刺激群では、培養 7 日後 (電気刺激 1 日後) には対照群と同様であったが、培養 10 日後および 12 日後には対照群と比べて有意に増加した ($p < 0.05$)。両群とも、筋管細胞数は最大になった後、減少し始め、培養 14 日以降、電気刺激群と対照群との間に有意な差は認められなかった。

筋管細胞の最大横径は、対照群、電気刺激群ともに培養 7 日以降増加し、電気刺激群の方が太かった (図 8)。培養 14 日後には、電気刺激群の最大横径が対照群より有意に太かった ($p < 0.05$)。

培養 16 日後に、電気刺激群で筋管細胞の細胞質に横紋構造が認められた (図 9)。培養 18 日後には、電気刺激群のみで、発達した筋線維が収縮頻度の低い自動収縮を始めた (動画は、<http://home.hiroshima-u.ac.jp/yugelab/experiment.htm> にて参照)。培養 21 日後には、対照群では筋管細胞が細くなった。電気刺激群でも全体的に細い

筋管細胞がみられたが、一部の成熟した筋管細胞には収縮頻度が一定した律動的な収縮が観察され、隣接する筋管細胞同士では同期した収縮が観察された。

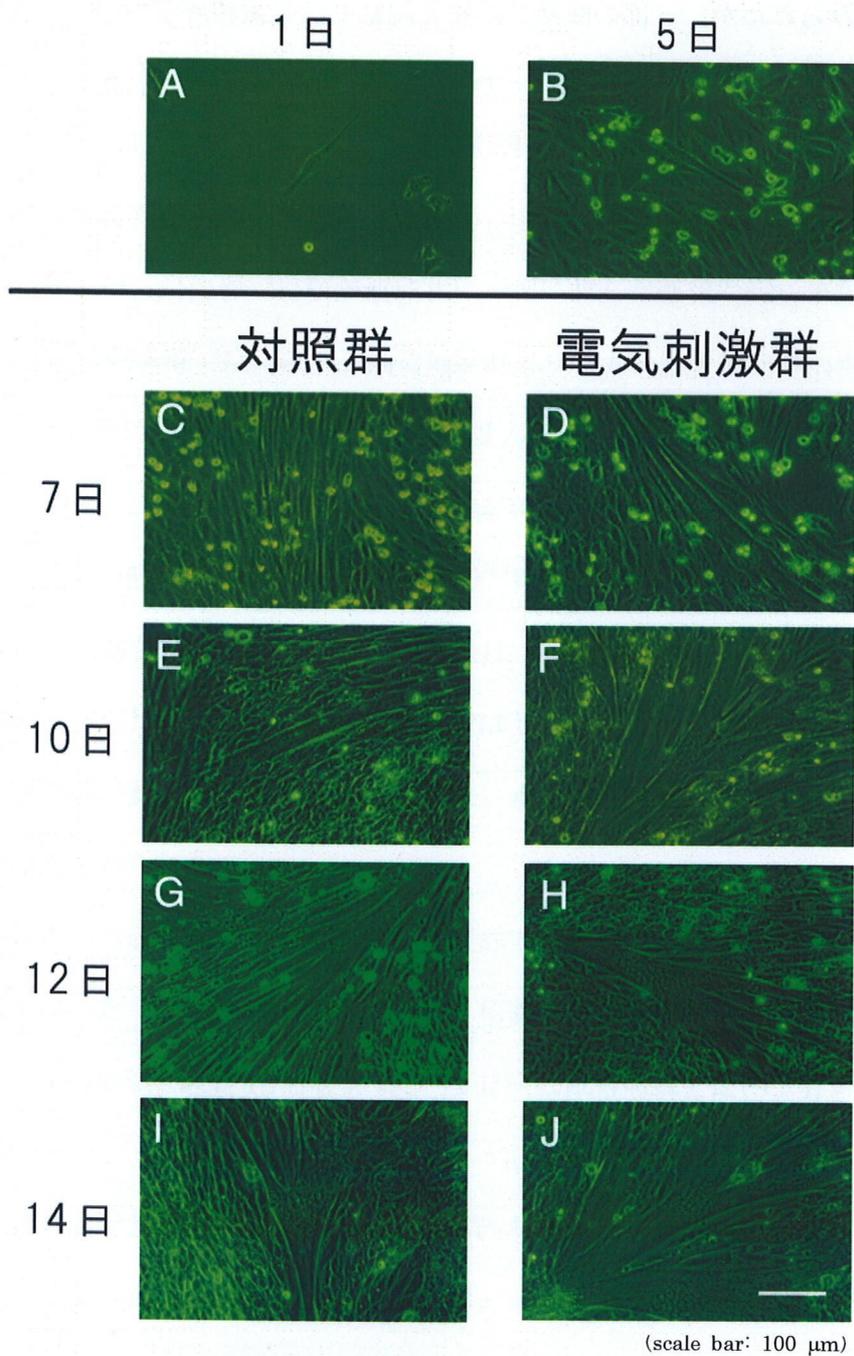


図6 電気刺激による培養筋芽細胞の形態変化

培養1日後の細胞は、単核の紡錘形であった(A)。培養5日後に細胞融合が始まり、多核の小さな筋管細胞がみられた(B)。培養7日後は、対照群では核が一行に並んだ筋管細胞(C)が、電気刺激群では核が二行に並んだ筋管細胞(D)がみられた。培養10日後(E, F)、培養12日後(G, H)は、対照群と電気刺激群ともに筋管細胞が発達している様子が観察された。培養14日後は、対照群では四列以上の核をもつ筋管細胞(I)が、電気刺激群では七列以上の核をもつ太い筋管細胞(J)が認められた。

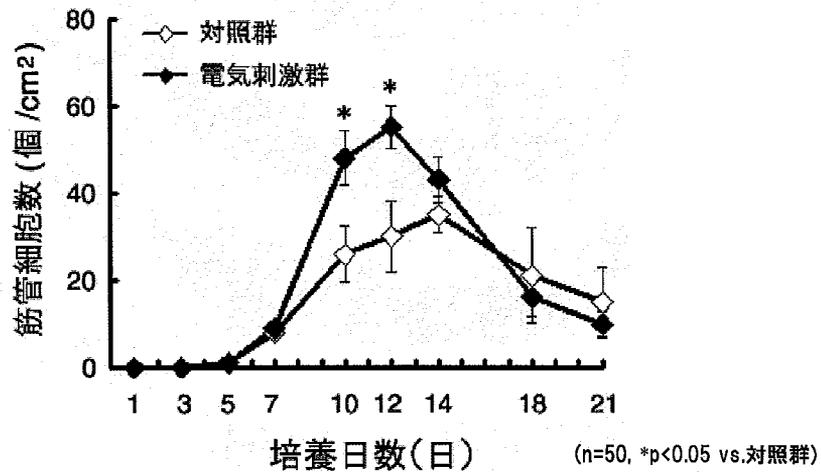


図7 筋管細胞数の経時的変化

筋管細胞は培養 5 日後から発生し始めた。筋管細胞数は、電気刺激群では培養 12 日後に、対照群では培養 14 日後に最大となった後、減少した。培養 10 日後と 12 日後は、電気刺激群の筋管細胞数が、対照群より有意に多かった (*p<0.05)。

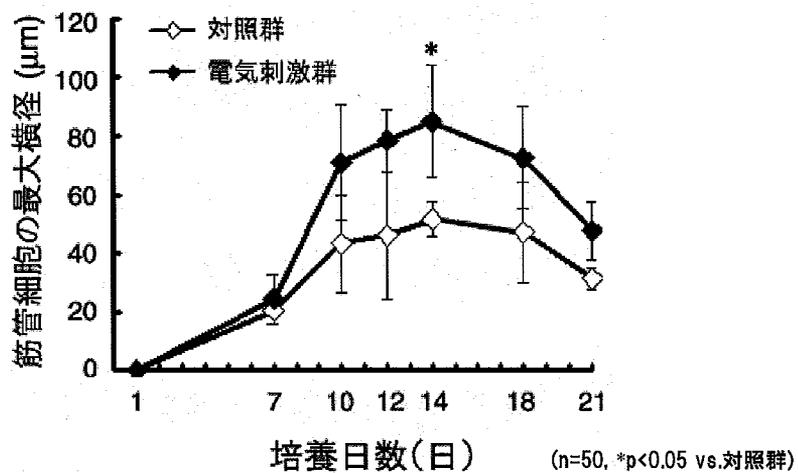
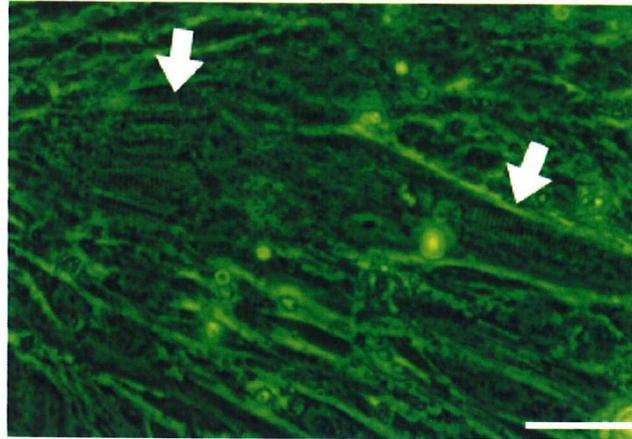


図8 筋管細胞の最大横径の経時的変化

筋管細胞の最大横径は、培養 14 日後に最大となり、電気刺激群では対照群より有意に太かった (*p<0.05)。



(scale bar: 50 μm)

図9 電気刺激による横紋のある筋線維の発生(位相差顕微鏡像)

培養 16 日後には、電気刺激群でのみ、横紋(矢印)のある筋線維にまで発達した細胞が観察された。

第3項 筋分化マーカーのmRNA発現

筋の分化と成熟に関わる myogenin と myf-6 の mRNA 発現を検討した (図 10)。

myogenin は、培養 5 日後から発現がみられた。電気刺激群では、培養 10 日以降、培養日数の経過とともに発現量が減少した。対照群では、培養 20 日後でも強く発現していた。

myf-6 の発現は、培養 10 日後の電気刺激群において強かった。対照群でも培養 10 日後に発現がみられたものの、電気刺激群と比較して弱かった。その後、電気刺激群では発現が減少したのに対し、対照群では発現が持続した。

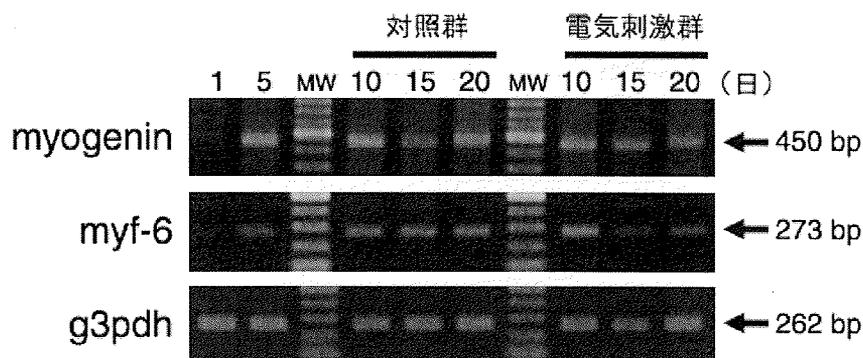


図 10 電気刺激による筋分化マーカー mRNA 発現の経時的変化

培養 5 日後から myogenin の発現がみられた。電気刺激群では、培養 10 日以降、その発現量は減少した。myf-6 は、培養 10 日後の電気刺激群で最も強い発現を示した。内部標準遺伝子である g3pdh の発現は一定であった。lane MW は、100 bp DNA ladder である。

第 4 項 筋分化マーカーのタンパク質発現

筋の分化マーカーである MyoD ファミリーと M-カドヘリンのタンパク質発現を検討した (図 11).

MyoD と myf-5 は, 培養 1 日後から発現しており, 5 日後にも発現が確認された. 電気刺激群ではこれらのタンパク質を培養 10 日後と 15 日後にも発現していたが, 対照群では培養 15 日以降発現していなかった.

myogenin の発現は, 対照群では培養 15 日後に減少したが, 電気刺激群では培養 15 日後にも発現が継続しており, 培養 20 日後に減少した.

myf-6 の発現は, 両群ともに培養 5 日後から 20 日後まで継続したが, その発現レベルは電気刺激群の方が強かった.

M-カドヘリンは, 電気刺激群で培養 10 日以降, 強い発現レベルを維持したが, 対照群では発現しなかった.

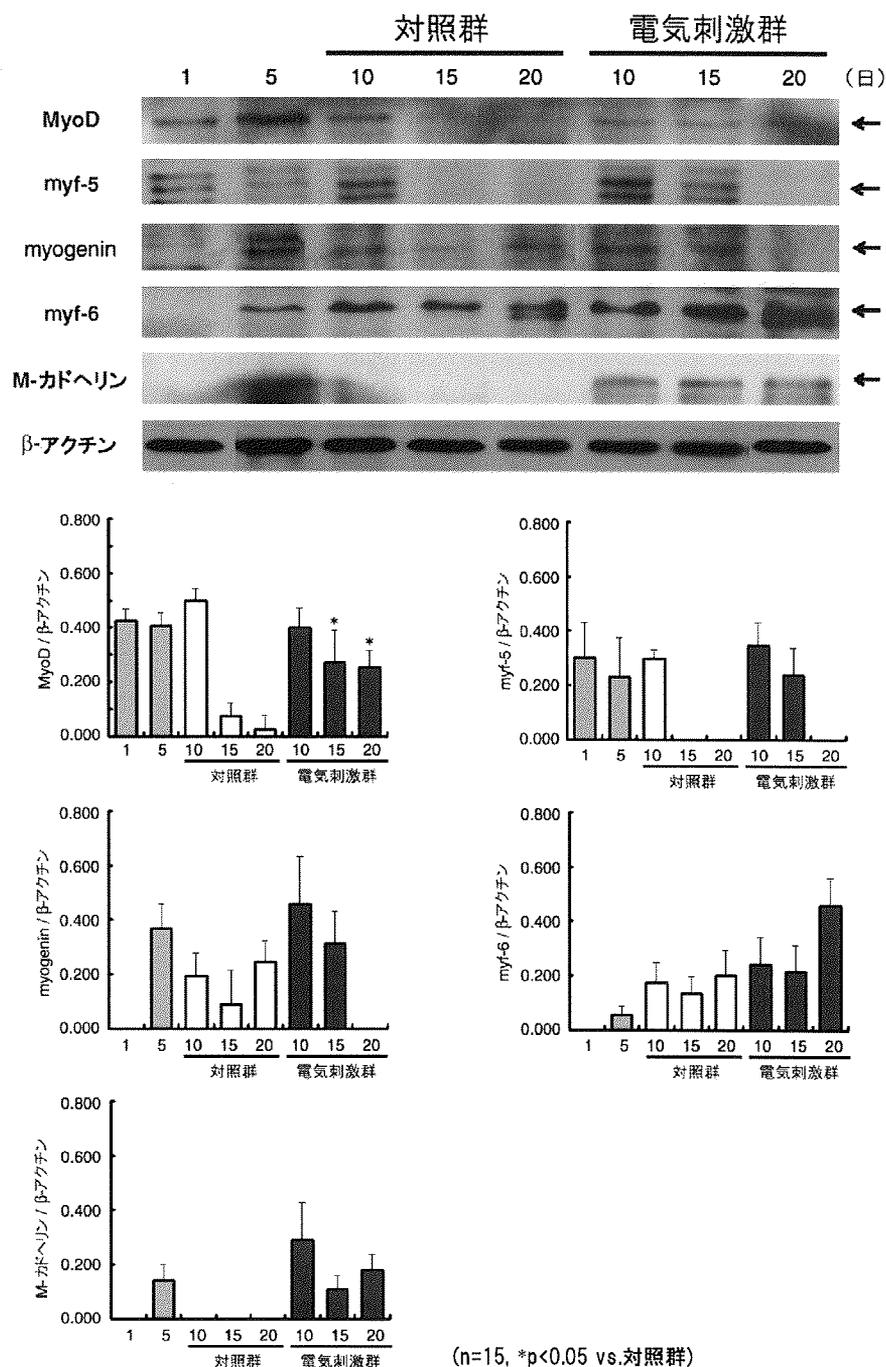


図 11 電気刺激による筋分化マーカータンパク質発現の経時的変化

MyoD は、培養 5 日後に強く発現し、その後、緩やかに減少した。myf-5 は、培養 10 日後の電気刺激群で最も強く発現した。myogenin は、電気刺激群では培養 10 日後と 15 日後に強く発現した。myf-6 の発現は、電気刺激群では経時的に増加したが、対照群では一定であった。M-カドヘリンは、培養 10 日以降、電気刺激群でのみ発現した。内部標準タンパク質である β -アクチンの発現は一定であった。

第4節 考察

第1項 電気刺激条件

本研究では、予備実験の結果から、矩形波、刺激頻度：0.5 Hz、持続時間：2.0 msec、電圧：50 V、刺激時間：1日おきに1日1回5分間という電気刺激条件を設定した。

これまでに、初期培養の筋衛星細胞に神経活動を模倣した持続的な低頻度の電気刺激を行った実験では、ミオシン重鎖の発現が変化することが報告されている¹⁴⁾。また、Stern-Straeterら¹⁵⁾は、筋衛星細胞を二次元培養および三次元培養して電気刺激を行い、三次元培養ではMyoD発現が増加すること、Pedrottyら¹⁶⁾は、三次元培養中の筋芽細胞に心筋の活動に似た電流を流し、電気刺激により筋分化よりも筋芽細胞の増殖が促進されたと報告している。これらの刺激条件¹⁴⁻¹⁶⁾は、生体の電気信号を基に設定されており、本研究の刺激条件と比較して強い刺激である(表2)。

これまでに、筋芽細胞から収縮する筋細胞に分化・成熟した報告はなく、培養実験で収縮する筋に分化させることは難しいと考えられる。本研究での断続的な電気刺激条件は、筋芽細胞の分化に最も良い条件の一つであると思われる。

表2 電気刺激条件の比較

	刺激頻度 (Hz)	持続時間 (msec)	刺激時間	電圧 (V)	電流 (mA)
本研究	0.5	2.0	5分/1日1回 4日	50	0.4
Wehrleら ¹⁴⁾	2.5	250	13日間	—	4.0-8.0
Stern-Straeterら ¹⁵⁾	2.5	250	8日間	—	6.8
Pedrottyら ¹⁶⁾	0.5-10	0.5-200	14日間	—	1.56

第 2 項 電気刺激による筋分化促進

本研究の形態学的観察の結果は、筋芽細胞同士が融合して筋管細胞を形成し、その後、筋管細胞が成熟して筋線維になるという筋分化の過程を示しており、電気刺激群では対照群より分化が促進された。

L6 細胞株は、1968 年に Yaffe により樹立されたラット骨格筋由来の筋芽細胞で、細胞融合して無秩序に筋管細胞を形成することが知られている³⁴⁾。L6 細胞株は、分化誘導 10 日前後に筋管細胞の形成が最大となることが報告されており³⁵⁾、対照群の形態変化はこの報告と一致した。電気刺激群でも筋管細胞の形成は無秩序で、予備実験でも、電極の極性に関係なく形成された。筋管細胞数は、培養 5 日以降に増加し、電気刺激群では培養 12 日以降、また、対照群では 14 日以降、経時的に減少した。この理由は、筋管細胞がある程度形成された後、筋芽細胞同士の融合だけでなく、隣接する筋管細胞同士の融合も始まったためと考えられる。筋管細胞の最大横径の変化からも、培養の後半に太い筋管細胞が観察されており、筋管細胞同士の融合の結果、筋管細胞数は減少するものの、径の太い筋管細胞が多くなったと推察される。

筋の分化は、MyoD, myf-5, myogenin, MRF-4 (myf-6 別名 herculin) で構成される MyoD ファミリーによって制御されている³⁶⁾。myogenin は、筋の融合と筋管細胞の形成に関与し³⁷⁾、MRF-4 とともに筋芽細胞から筋線維への分化を促進する³⁸⁾といわれている。本研究において、myogenin タンパク質は、培養 5 日後から発現し、電気刺激群では培養 15 日後、対照群では培養 10 日後まで発現した。筋管細胞の数は培養 5 日以降増加し、培養 12 日後または 14 日後までその数が増え続けた形態観察の結果とも一致する。MRF-4 は、筋管細胞の成熟過程に関わっており、筋管細胞の形成初期に発現するだけでなく、筋管細胞の成熟過程で発現が最大となる^{39,40)}。加えて、M-カドヘリンは、筋芽細胞に発現し、筋管細胞の形成が誘導された後に発現が強くなることが知られている^{41,42)}。Zeschnigk ら⁴³⁾は、骨格筋細胞において、M-カドヘリンが分化の最終段階に重要な役割を担っていることを報告している。したがって、本研

究において、電気刺激群で培養 15 日以降の myf-6 (MRF-4) 発現が強くなったこと、電気刺激群でのみ M-カドヘリンが発現したことは、形態的に筋が成熟した結果を支持するもので、分子細胞生物学的にも、電気刺激によって筋の分化が促進されたことを示している。

第5節 まとめ

筋芽細胞の分化過程において、培養細胞に電気刺激を加え、その影響を形態学的、分子細胞生物学的解析により検討した。

その結果、電気刺激群では、対照群と比較して太い筋管細胞が多数観察され、その発生時期も早かった。さらに、電気刺激を行った細胞は、横紋のある筋線維にまで分化し、自動収縮能のある成熟した筋細胞になった。また、筋分化マーカーの発現を mRNA レベルとタンパク質レベルで解析した結果から、電気刺激による筋分化促進効果が確認できた。特に、電気刺激を行った細胞では、筋分化の最終マーカーである myf-6 と M-カドヘリンの発現が強く、通常培養の細胞とは全く異なる発現パターンを示した。

第3章 電気刺激による培養筋芽細胞の筋収縮への影響

第1節 目的

前章にて、筋芽細胞は電気刺激により分化が促進され、最終的に筋収縮能を持つ筋線維まで分化した。そこで本章では、電気生理学的解析を行うとともに、分化促進メカニズムを解明するため、筋分化に関与する β_1 -インテグリンと β -カテニンおよびギャップ結合を構成するコネキシン43 (connexin43 : Cx43) について検討した。

第2節 方法

第1項 実験条件

前章の実験と同様の手順で行った 2.5×10^5 個の筋芽細胞 (L6 細胞株) (IFO 50364: Health Science Research Resources Bank) を 90-mm 培養皿 (NUNC A/S) に播種し、増殖培地にて培養した。

培養6日後に細胞がコンフルエントとなったことを確認した後、分化誘導培地に交換した。

電気刺激には、電気刺激装置 SEN-2201 (Nihon Kodan Co.) を使用し、培養6日、8日、10日、12日後の計4回実施した (電気刺激群)。電気刺激条件は、前章で示した通りである。なお、電気刺激を実施せず、通常培養したものを対照群とした。

第2項 電気生理学的解析

微小電極は、ガラス・キャピラリー (Harvard Apparatus Ltd., Kent, UK) を加工して作成した。微小電極の電気抵抗は、2 M 塩化カリウム溶液に浸した際に 10~15 M Ω とした。細胞膜電位の計測は室温で、電解質溶液 (10 mM HEPES (pH 7.4), 135

mM 塩化ナトリウム, 5.4 mM 塩化カリウム, 1 mM 塩化カルシウム, 1 mM 塩化マグネシウム, 0.33 mM リン酸ナトリウム, 5.5 mM グルコース) を還流させながら, 微小電極を細胞の中央部から細胞質内に挿し込み, patch clamp amplifier (Axopatch 200B: Axon Instruments, Foster City, California, USA) を用いて行った.

第3項 分子細胞生物学的解析

1) Western blot 法

前章の実験と同様の手順で行った. 2 x サンプリングバッファーにて培養細胞を回収し, 5 分間, 加熱変性させて試料を調整した. 濃度測定後, 12.5% ポリアクリルアミド・ゲルにて SDS-PAGE を行った. 1 レーン当たりのタンパク質量が 20 μ g または 10 μ g になるように試料をアプライし, 電気泳動終了後, ゲル中のタンパク質をニトロセルロース膜 (HybondTM-ECL: Amersham Biosciences UK Ltd.) に転写した. 4°C で一晩ブロッキングした後, 一次抗体と 4°C で一晩反応させた. 使用した一次抗体と希釈倍率は, 以下の通りである. 抗 β_1 -インテグリン抗体 (AB1952P: Chemicon International, Inc., Temecula, California, USA) (1:2,500), 抗 β -カテニン抗体 (13-8400: Zymed Laboratories, Inc., Minneapolis, Minnesota, USA) (1:500), 抗 Cx43 抗体 (AB1727: Chemicon International, Inc.) (1:1,000). 内部標準タンパク質には, 抗 β -アクチン抗体 (Sigma-Aldrich Co.) (1:1,000) を用いた. 二次抗体には HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Cell Signaling Technology, Inc.) (1:10,000) を使用し, 室温にて 1 時間反応させた. LumiGLO[®] reagent (Cell Signaling Technology, Inc.) と反応させ, X 線フィルム (HyperfilmTM ECL: Amersham Biosciences UK Ltd.) に露光して現像した.

2) 免疫染色法

2.5 x 10⁵ 個の筋芽細胞をカバースリップ (Matsunami Glass Ind.,Ltd., Osaka, Japan) を敷いた 90-mm 培養皿 (NUNC A/S) に播種し培養した。

カバースリップを洗浄後, 冷アセトンで細胞を固定した。100% エタノールで 5 分間処理し, 3% BSA 入りの PBS で 10 分間ブロッキングした。一次抗体には, 抗 Cx43 抗体 (Chemicon International, Inc.) (1:100) を用い, 室温で 30 分間反応させた。二次抗体には, Alexa Fluor®488 goat anti-mouse IgG (H+L) (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, USA) (1:100) を用い, 室温で 10 分間反応させた。核の染色には, プロピジウム アイオダイド (propidium iodide : PI) (Molecular Probes, Inc.) を使用した。試料は, VECTASHIELD® Mounting Medium (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, California, USA) を用いて, スライドガラス (Matsunami Glass Ind.,Ltd.) 上に封入した。標本は, 蛍光顕微鏡 (TE300 Eclipse: Nikon Co.) にて観察した。

第 4 項 統計学的解析

数値は, 平均±標準偏差 (SD) で表した。統計解析は, StatView Ver. 5.0 (SAS Institute Inc.) を用いて行い, 二元配置分散分析 (two-way ANOVA) および post hoc test (Scheffe 法) の結果, 0.05 未満を有意水準とした。

第3節 結果

第1項 活動電位の計測

電気刺激群にみられた自動収縮中の細胞の活動電位を図12に示す。静止電位の平均は、収縮している細胞（電気刺激群）では -59.4 ± 9.2 mV、収縮しない細胞（対照群）では -18.0 ± 6.8 mV（いずれも $n=4$ ）であり、電気刺激群では有意に低下した ($p < 0.05$)。

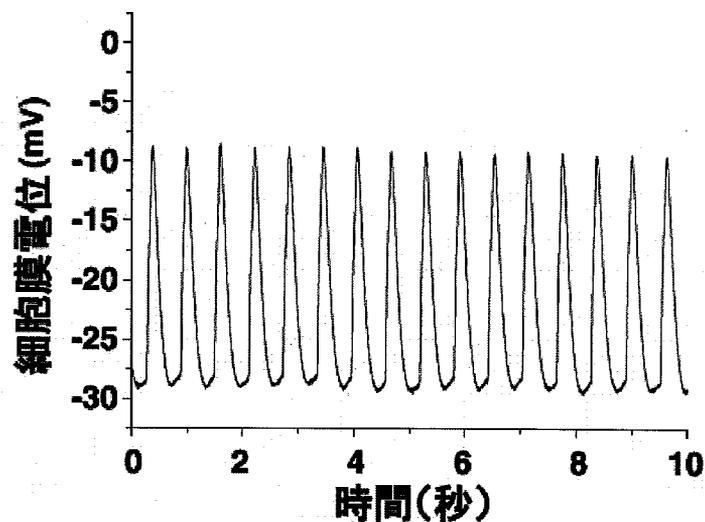


図12 収縮している細胞の細胞膜活動電位

電気刺激群でみられた収縮する筋線維の電位変化は21mV（-28 mV から -7 mV）、収縮頻度は1.6 Hz、最大立ち上がり速度は0.4 から0.6 V/sであった。対照群では、活動電位を示すような変化は計測されなかった。

第2項 筋分化メカニズムに関するタンパク質発現

β_1 -インテグリンと β -カテニンの経時的なタンパク質発現を図13に示す。

β_1 -インテグリンは、培養1日後から発現した。電気刺激群では培養10日後に強く発現し、その後、減少傾向がみられた。一方、対照群では培養10日以降、弱い発現がみられた。

β -カテニンは、培養5日後に強く発現した。電気刺激群では、培養10日後にも強く発現し、その後減少した。対照群でも、その発現は経時的に減少した。

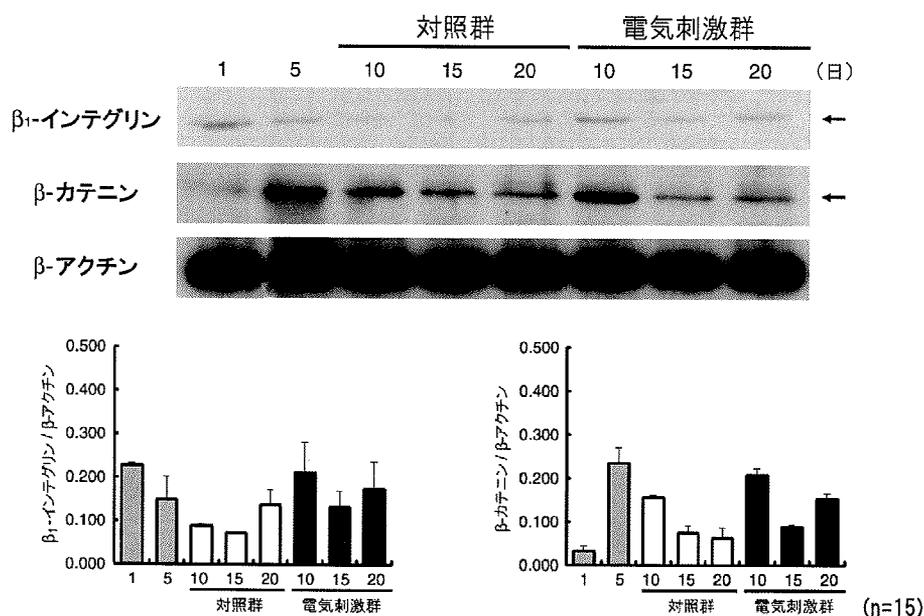


図13 筋分化メカニズムに関するタンパク質発現の経時的変化

β_1 -インテグリンは、培養1日後から発現し、電気刺激群では培養10日後に強く発現した。 β -カテニンは、培養5日後に強く発現し、両群に差はみられなかった。内部標準タンパク質である β -アクチンの発現は一定であった。

第3項 カルシウムチャネル関連タンパク質発現

western blot 法を用いた Cx43 タンパク質の経時的な発現を図 14 に示す。培養 5 日後に弱い発現がみられた。対照群では培養 10 日以降、Cx43 の発現量は減少した。しかし、電気刺激群の Cx43 発現は、培養 10 日後、15 日後と経時的に増加し、培養 20 日後まで持続していた。

培養 17 日後の Cx43 免疫染色像においても、電気刺激群では、対照群と比較して Cx43 が細胞膜上に強く発現していた (図 15)。

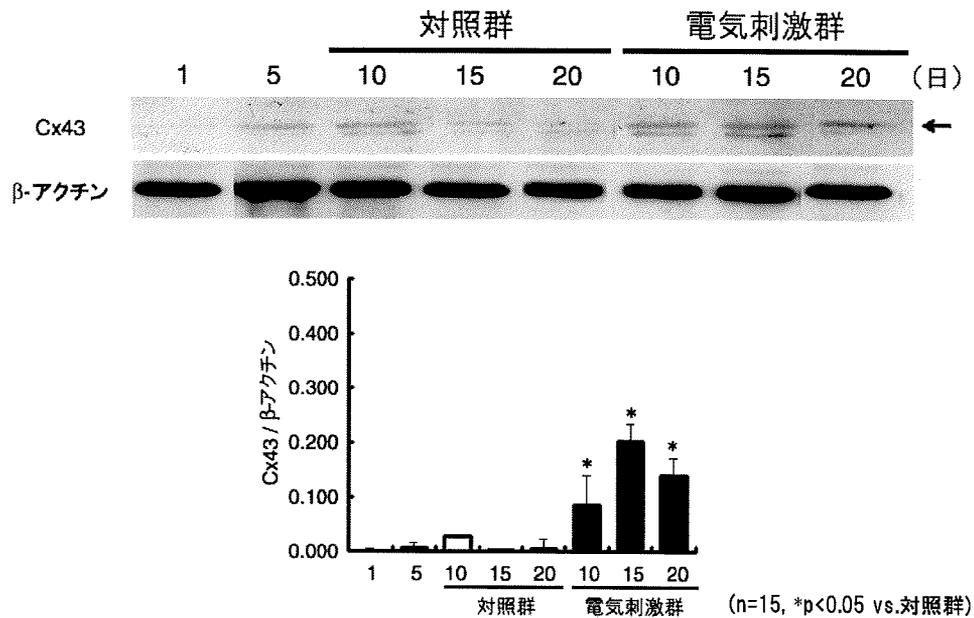


図 14 電気刺激による Cx43 タンパク質発現の経時的变化

ギャップ結合を構成する Cx43 は、培養 10 日以降、電気刺激群で強く発現した。内部標準タンパク質である β -アクチンの発現は一定であった。

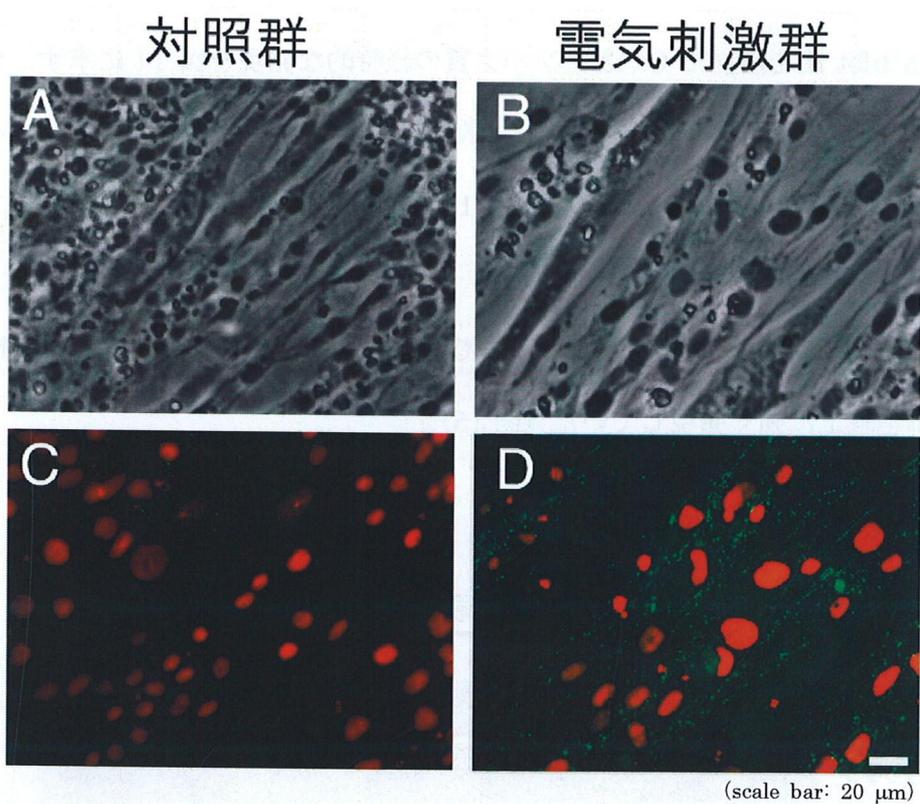


図 15 電気刺激によるCx43発現(培養17日後)

対照群および電気刺激群において、同じ視野で撮影した位相差顕微鏡像 (A, B) と免疫染色像 (C, D) を示す. Cx43 (緑色) は、電気刺激群でのみドット状の点として観察された. 核はPIで染色した (赤色).

第4節 考察

第1項 電気刺激による筋分化促進メカニズム

細胞外環境からの物理的刺激は、細胞接着分子を介して細胞内に伝達され、筋細胞の増殖や分化を制御している¹⁷⁻²⁴⁾。本研究では、筋分化に関与する細胞接着分子である β_1 -インテグリンとM-カドヘリンについて検討した。

インテグリンは、遺伝子発現、細胞の増殖や分化、細胞死など多くの細胞現象に関与しており^{17, 25-27)}、その働きは、筋の分化でも同様である¹⁸⁾。インテグリンは、細胞外マトリックスと細胞骨格を連結する役割を担っており、細胞は、インテグリンを介して細胞自身を取り巻く環境から受ける物理的シグナルを感知して細胞内に伝え、細胞応答が誘導される²⁵⁻²⁷⁾。インテグリンファミリーは、膜貫通糖タンパク質で六量体を形成している。この六量体は、 α -サブユニットと β -サブユニットから構成されており、前者は16種類、後者は8種類ある¹⁷⁾。細胞質内の β -サブユニットは、細胞骨格に連結している(図3-B)ことから、 α -サブユニットよりも重要視されている。

筋特異的サブユニットは、 β_1D -サブユニットで¹⁹⁾、骨格筋と心筋において特異的に発現している。 β_1D -サブユニットは、筋芽細胞が分化して成熟する過程で発現する。本研究でも、筋が成熟した電気刺激群において、 β_1 -インテグリンの発現が強かった。一方で、培養1日後にも β_1 -インテグリンの発現がみられたことには、筋の分化過程における β -インテグリンサブユニットの変化が関係していると考えられる。Belkinら²⁰⁾は、筋の分化過程では2種類の β_1 -インテグリンアイソフォームが発現することを報告している。彼らは、筋芽細胞で発現している β_1A -サブユニットは、分化が進むにつれて発現が減少し、細胞融合後、 β_1D -サブユニットと置き換わり、成熟した筋管細胞では β_1A -サブユニットが全く発現していないことを示している。

本研究では、 β_1A -サブユニットと β_1D -サブユニットを判別するまでには至らなかったが、通常培養した細胞では筋の分化とともに β_1A -サブユニットが減少し、電気刺激を行った細胞では、 β_1A -サブユニットから β_1D -サブユニットへの発現変化が起き

ている可能性がある。電気刺激群でみられた β_1 -インテグリンの発現増加から、インテグリンを介したシグナル伝達経路の活性化が、電気刺激による筋分化メカニズムに関与していることが示唆される。

筋分化メカニズムに関しては、インテグリンだけでなく、カドヘリンを介したシグナル伝達経路も関与していることが知られている²¹⁻²⁴⁾。カドヘリンは、細胞膜で β -カテニンと複合体を形成しており、この β -カテニンを介して細胞骨格と連結されている (図 3-C)。 β -カテニンは、二つの全く異なる機能をもつ細胞内分子で、細胞膜だけでなく、核内にも存在する。細胞質にある β -カテニンは、細胞表面膜にあるカドヘリンと結合して、カドヘリンとアクチンフィラメントとを連結させる機能をもつ。もう一つの機能として、核内にある β -カテニンには、転写因子と結合し、細胞の増殖あるいは発生運命の決定に関与する遺伝子の転写を活性化する働きがある。この核内の β -カテニンは、胚の発達や成人の筋再生にも関与している^{44,45)}。Goichberg ら²¹⁾は、筋芽細胞を分化培地に移すと β -カテニンが増加し、カドヘリン複合体へ移行すること、この過程が myogenin の発現に重要であることを報告している。一方、Kramerova ら²²⁾は、カルパイン 3 ノックアウトマウス由来の筋芽細胞では、正常マウス由来の筋芽細胞よりも多核の筋管細胞を形成するものの筋線維まで分化しないこと、この時、M-カドヘリンと β -カテニンは筋管細胞の細胞膜に蓄積しており、 β_1 D-インテグリンの発現も抑制されることを報告している。

本研究では、電気刺激した細胞でのみ M-カドヘリンの発現がみられた。しかし、 β -カテニンは、対照群と電気刺激群の両群で発現しており、その発現パターンには差がみられなかった。

インテグリンやカドヘリンといった細胞接着分子に焦点を当てた筋分化メカニズムについては、その下流の β -カテニンや Rho A を代表とする低分子量 G タンパク質の関与も指摘されているが^{23,24)}、いまだ不明な点が多く、統一された調節機構が示されていない。本研究においても、 β_1 -インテグリンや M-カドヘリンの関与が示唆される

ものの、 β -カテニンがその中心となって筋分化を調節しているか否かを判定するまでには至らなかった。電気刺激による詳細な筋分化促進メカニズムについて、細胞内の β -カテニンの局在も含め、インテグリンやカドヘリンの下流を今後さらに検討する必要がある。

第2項 電気刺激による筋収縮メカニズム

本研究で行った細胞膜活動電位の測定では、電気刺激群において、活動電位の特徴である静止電位の低下はみられたものの、電気生理学的な活動電位の計測は難しかった。収縮している筋線維に微小電極を挿し込む作業は、非常に困難であり、わずかな電位変化の蓄積によって、電流の漏れが生じたと考えられる。このことは、計測された頂点間振幅が、わずか 20 mV であったことから推測できる。しかしながら、計測結果からは、電気刺激を行った細胞において、3 種類のイオンチャンネルが機能的に発現している可能性が考えられる。すなわち、収縮している細胞で静止電位が低下したことから、① K^+ チャンネルの発現が増加している可能性、② 活動電位発生の必要条件である Na^+ チャンネルまたは Ca^{2+} チャンネルが発現している可能性がある。さらに、いくつかの細胞が同期して収縮し、微小電極の挿入によって収縮する範囲が限定されたことから、③ ギャップ結合の存在が示唆される。

ギャップ結合は、細胞と細胞をつないで、イオンや代謝物、シグナルを細胞内に拡散させる経路であり、さまざまな組織を形成する胚の発達にも GJIC が関与していると考えられている³¹⁾。このギャップ結合を介した GJIC は、骨格筋の分化において、MyoD ファミリーの発現調節に関与していることも知られている³¹⁻³³⁾。また、ギャップ結合を構成する Cx43 タンパク質の発現は、筋芽細胞同士の融合により筋管細胞を形成する際に増加すること^{46,47)}が報告されている。

本研究において、電気刺激を行った細胞で Cx43 の発現が増加したことは、細胞接着分子と併せ、筋分化促進メカニズムの一つと考えられる。さらに、上述の電気生理学的な側面とも併せて、電気刺激の効果である筋収縮メカニズムの一つとも考えられる。

第5節 まとめ

電気刺激により培養筋芽細胞が成熟した筋線維にまで分化し、自発的な筋収縮を始めた前章の結果を受け、本章では、電気生理学的検討とともに、筋分化メカニズムに関与する β_1 -インテグリンと β -カテニンおよび興奮に関与するギャップ結合について検討した。

収縮中の細胞の細胞膜活動電位を計測し、活動電位に近い波形を測定することができた。 β_1 -インテグリンのタンパク質発現は、電気刺激群で強く、 β -カテニンのタンパク質発現は両群に差がなかった。ギャップ結合を構成する Cx43 タンパク質は、電気刺激を行った細胞にのみ発現していた。このことから、電気刺激による筋分化促進メカニズムには、細胞接着因子である β_1 -インテグリンや Cx43 が、収縮能のある筋線維の出現には Cx43 の関与が示唆された。

第4章 考察

第1節 電気刺激療法の効果

筋の分化は、筋芽細胞同士が融合して筋管細胞を形成し、その後、筋管細胞が成熟して筋線維になる過程を辿る。筋発生の過程で、筋芽細胞の一部は、筋再生時に増殖して新しく筋線維を形成する際の幹細胞として生後も筋線維の周囲に存在し、筋衛星細胞とよばれる。筋衛星細胞は、正常の筋でも存在する未分化な細胞であり、必要に応じて増殖・分化して筋を再生する。損傷を受けた筋の治癒過程は、筋発生の過程と類似し、骨格筋細胞は、主に筋衛星細胞によって組織を再生する。受傷した筋は、マクロファージなどの刺激により筋衛星細胞の活性化が起こり、筋芽細胞が増殖し、筋芽細胞が融合して筋管細胞となり、筋線維のもととなる。成人骨格筋の障害時、あるいは筋疾患で生ずる筋再生は、筋衛星細胞が種々の刺激により増殖・分化し、傷害された筋線維を修復あるいは置換する過程である。

骨格筋の分化過程は、筋特異的転写調節因子である MyoD ファミリーによって制御されている³⁶⁾。加えて、Zeschnigk ら⁴³⁾は、骨格筋細胞において、M-カドヘリンが分化の最終段階に重要な役割を担っていることを報告している。

本研究において、形態学的観察の結果は筋の分化過程を示しており、電気刺激群では対照群より筋分化が促進された。さらに、電気刺激を行った細胞で myogenin, myf-6 および M-カドヘリンの発現が強かったことは、分子細胞生物学的にも、電気刺激によって筋の分化が促進されたことを示す結果といえる。

電気刺激は、整形外科領域やリハビリテーション領域で、筋萎縮の治療法として日常的に利用されている。本研究で使用した電気刺激条件は、これまでに他の研究グループから報告されている刺激条件¹⁴⁻¹⁶⁾と比較し、臨床条件（一般的に1日10～20分）に近く、筋芽細胞の分化に最も良い条件の一つであると思われる。

第2節 筋分化促進と細胞接着因子

多細胞生物は、細胞、組織、器官、個体と段階的に構成されている。細胞同士は多様な分子機構によりお互いを認識、識別することができ、この識別は、胚発生時における形態形成や組織構築に重要で、これにより異種の細胞が不適切に混合することなく同種の細胞が集合し、組織や臓器が形成される²⁸⁾。例えば、細胞がダイナミックに移動する胚発生や創傷治癒の過程には、適切な細胞外マトリックスと細胞との接着が必須である。接着性の細胞は、適切な細胞外マトリックスとの接着を失うと増殖の停止、または細胞死を引き起こす。つまり、細胞と細胞外マトリックス間との細胞接着は、環境センサーとして機能し、液性因子と協調して、細胞の増殖、分化、生存、移動などを細胞外環境に応じて制御している。すなわち、多細胞生物が個体として生命を維持していくためには、様々な状況で細胞が適切な細胞外マトリックスと接着することが必要である。その細胞間の接着には、細胞外マトリックスや細胞膜に存在する細胞接着分子、および細胞接着分子の細胞内の連結物としての細胞骨格が重要な役割を果たしている^{25,28)}。

細胞接着分子とは、細胞接着を担う膜タンパク質で、細胞と細胞の接着結合の形成と維持に関与するカドヘリン、細胞と細胞外マトリックスの接着に関わるインテグリンが、その代表である(図3)。多様な接着分子は、それぞれが結合特異性を示し、カドヘリンは、他の細胞が発現する同種のカドヘリンに選択的に結合することで細胞の選別と接着を行っている²⁸⁾。インテグリンは、接着を迅速に変化させることによって細胞接着だけでなく細胞移動も調節しており、個体発生や臓器形成に重要である²⁸⁾。細胞認識と細胞接着は密接な関係にあり、ある種の細胞は細胞表面に接着分子を発現し、同種の接着分子のみと結合することで細胞の認識と接着、集合を行っており、このような細胞接着の分子機構により、特定の組織や臓器の形成に必要な細胞同士の集合が可能となる。

このように、多細胞生物の発生と生理機能の維持には、分子の相互作用を基盤とし

た細胞間コミュニケーションが必須である。細胞間コミュニケーションは、常に細胞内の情報伝達と連動し、細胞の機能や活動に影響を与え、細胞内外の情報伝達に関する膨大な数のシグナル分子は、それらが単独または複合体として機能し複雑な情報ネットワークを形成し、多様な反応を引き起こす。

物理的刺激が、細胞の増殖や分化といった細胞の活動を制御するメカニズムとして、細胞接着分子を介したシグナル伝達が挙げられる²⁵⁻²⁷⁾。本研究において、電気刺激群ではM-カドヘリンと β_1 -インテグリンの発現が増加した。電気刺激による筋分化促進メカニズムとして、これら細胞接着分子を介した細胞内シグナル伝達が考えられる。

細胞間のシグナル伝達システムの一つであるギャップ結合は、細胞同士の微細構造の連結によって形成され、その細胞表面に局在する微細構造体（コネクソン）は、カルシウムイオン、サイクリックアデノシン 3',5'-リン酸（cAMP）、グルタチオン、アミノ酸、単糖およびヌクレオチドなど、分子量 1,000 以下の生理活性分子や電気的なシグナルを隣接した細胞同士でやりとりする機能を有しており、多細胞動物が生命を維持していくために必須のシステムである²⁸⁾。このようなコネクソンは、コネキシン（Cx）という 4 回膜貫通型タンパク質の六量体からなり、2 個の細胞の間でこの六量体の構造体が連結することにより、ギャップ結合が完成する²⁸⁾。このギャップ結合は、常時細胞表面に発現しているわけではなく、細胞周期や発生の段階、組織の状態あるいは組織の差異によって発現レベルが異なる。ギャップ結合を介して細胞間を浸透する低分子のうち、特に重要なものはカルシウムイオンであり、脳、心臓、平滑筋あるいは神経筋連結部位においては電気的なシグナル（電位）が組織を形成する細胞間で瞬時に伝達され、同期化した組織の活動に寄与している。

骨格筋において、Cx43 は筋衛星細胞に発現しており、筋損傷時、筋芽細胞同士が融合して筋管細胞を形成する際に発現が増加することが報告されている⁴⁶⁻⁴⁸⁾。つまり、筋再生時、Cx43 は筋発生と同様に筋分化の重要な因子である。筋芽細胞である L6 細胞株でも Cx43 は発現しており、筋分化に関与していることが知られている⁴⁷⁾。

本研究において、電気刺激群では筋分化が促進され、通常、筋管細胞までにしか分化しないL6細胞株が収縮する筋線維となった。この細胞の電気生理学的解析により、電気刺激を行った細胞にギャップ結合のある可能性が示唆され、Cx43の発現解析により、電気刺激群ではギャップ結合が存在することを確認した。

骨格筋細胞は、周辺部に核が存在する多核の細胞で、横紋のある細長い形態が特徴である。心筋細胞にも横紋があるが、中央に1個の核をもった短冊状の形態をしている。電気刺激群でみられた収縮する筋線維は、骨格筋細胞の形態を呈しており、また、心筋の収縮に関わる心筋トロポニン抗体を用いてwestern blot法によるタンパク質発現を検討したが、対照群、電気刺激群ともに発現していなかったことから（データの記載無し）、電気刺激により骨格筋細胞が心筋細胞に形質転換したことを示す知見は、本研究では得られなかった。心筋細胞において、細胞接着分子がCxの局在や発現に関与することも報告されており^{49,50}、筋分化促進メカニズムと併せて筋収縮のメカニズムも解明していきたい。

本研究で行った電気刺激によって、L6細胞株が横紋のある成熟した筋線維にまで分化促進された要因として、電気刺激群では、 β_1 -インテグリンやM-カドヘリンといった細胞接着分子およびCx43のタンパク質発現が、対照群と比較して増加するという結果を得た。これまでに報告されている物理的刺激に対する細胞応答の研究として、軟骨細胞を用いた圧迫刺激²⁶、血管内皮細胞を用いたシェアストレス（剪断力）負荷²⁷において、細胞外からの物理的刺激により、インテグリンの発現が増加し、細胞内シグナル伝達の一つであるMAPKカスケードが活性化され、細胞死が抑制された²⁶、細胞増殖が促進された²⁷ことが報告されている。また、骨芽細胞の分化とMAPKカスケードの一つであるp38に関する報告^{51,52}では、伸長刺激によりp38が活性化されると骨分化が促進され⁵¹、重力低下（微小重力環境）によりp38の活性が低下すると骨分化が抑制された⁵²ことが示されている。筋分化に関して、MAPKカスケードの活性化は、MyoDファミリーの発現を誘導する^{4,5}。筋芽細胞でも、物理的刺激の一つ

である電気刺激が細胞接着因子を介して細胞内シグナル伝達を活性化したとすれば、その結果 MyoD ファミリーの発現が促進された可能性が考えられる。

第3節 電気刺激の筋再生医療への応用

再生医療は、幹細胞や分化させた細胞を使って、失われた体の細胞、組織、臓器の再生や機能回復を図る新しい治療法であり、21世紀の革新的な医療技術として期待されている。

幹細胞の一つである間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells: MSCs) は骨髄に存在し、骨・軟骨・脂肪・筋など中胚葉由来の組織に分化する能力をもつ^{53,54)}。骨髄採取は、既に白血病などの治療に使われている技術であり、比較的容易に行うことができる。自身の骨髄から採取した MSCs の使用は、免疫拒絶の心配がなく、胚性幹細胞 (embryonic stem cells) を使用する場合の倫理的問題もないため、MSCs を使用した再生医療に対する期待は大きく、臨床応用に向けた研究が世界的に行われ、一部、臨床治験も始まっている。

筋疾患では、有効な治療薬のない筋ジストロフィー症やパーキンソン病などの難病に対して、また、心筋梗塞に対しても幹細胞移植による治療が考えられている。筋の再生医療研究が始まった初期には、成熟した心筋細胞や骨格筋芽細胞による治療法が用いられた^{55,56)}が、最近では筋細胞に分化しうる前駆細胞または幹細胞を移植する報告⁵⁷⁻⁵⁹⁾が増えている。このような細胞治療は、筋疾患に対する新たな治療法としても注目されているが、移植した幹細胞が生体内で筋細胞に分化して機能することに関して否定的な意見もあり、その効果と臨床応用には、まだ多くの問題が残されている。心不全に対する幹細胞移植を例に挙げると、細胞移植後の心機能改善は、本質的な心筋細胞再生によるところは少なく、虚血心筋の修復に重要な微小循環の血行上の改善や、心筋細胞に分化していないものの、生着したドナー細胞から分泌されるサイトカインによる二次的な心筋保護効果によるところが大きいと考えられている⁵⁷⁾。

筋は、「収縮」という特徴的で必要不可欠な機能をもっている。培養細胞において、幹細胞から骨格筋様細胞や心筋様細胞を創り出す研究も行われている⁵⁷⁻⁶²⁾が、これまでに収縮する筋線維まではできていない。また、その方法は、筋の分化を誘導するサ

イトカインや分化のスイッチを入れる遺伝子の導入によるもので、このような条件で筋の誘導に成功したとしても、薬物による移植後の二次的な副作用や遺伝子操作によるがん化が懸念される。このように、筋再生に関する研究は発展途上であり、治療法として応用可能な、安全性の高い有用な技術開発が望まれている。

一方近年、細胞の増殖や分化が、サイトカインなどの液性因子の刺激だけでなく、物理的刺激によっても制御されることが分かってきた^{6-9, 11-14, 25-27, 51, 52, 63-66}。細胞を取り巻く環境からの物理的刺激が、細胞接着分子を介して細胞骨格に変化をもたらし、細胞の増殖や分化に影響を与えている。これまで、重力や磁場などの物理的刺激によって、細胞の増殖や分化が制御されることが報告されている^{6-9, 11-14, 25-27, 51, 52, 63, 64}。

本研究では、ラット骨格筋由来の筋芽細胞（L6 細胞株）の培養中に電気刺激を加えると、細胞接着分子の発現が増加し、通常、筋管細胞にまでしか分化しない細胞が、横紋をもつ筋線維にまで分化・成熟し、自動収縮能をもつ筋線維にまで分化するに至った。すなわち、臨床で行われている電気刺激療法の有効性を示すだけでなく、再生医療分野での細胞培養方法として、電気刺激が有用であることも示唆している。電気刺激のような物理的刺激は、液性因子と比べて制御しやすく、臨床応用した場合も、サイトカイン添加や遺伝子導入と比較して二次的副作用の心配が少なく安全性が高い。今後は、まず MSCs から筋芽細胞へ分化誘導する条件を探索し、最終的には、いまだ成功していない MSCs から成熟した筋の創出に発展させたい。

第4節 意義と今後の課題

電気刺激は、筋萎縮の治療方法として使われている。日常的に臨床で利用されているにも関わらず、この電気刺激が細胞レベルでどのような影響を及ぼしているかについて、不明な点が多い。本研究では、電気刺激による筋の分化促進作用を明らかにし、細胞レベルで、その治療効果とそのメカニズムの一端を示すことができた。さらに、再生医療の研究分野においても、電気刺激は、筋細胞への分化誘導法として有用な技術になりうると考える。

分子細胞生物学的解析から、電気刺激により① MyoD ファミリーや M-カドヘリンといった筋分化マーカーの発現が強くなること、② M-カドヘリンだけでなく、同じ細胞接着分子の一つである β_1 -インテグリンの発現も強くなること、③ Cx43 の発現が持続することが分かった。その結果、電気刺激による筋分化促進メカニズムとして、細胞接着分子 (M-カドヘリンと β_1 -インテグリン) を介した細胞内シグナル伝達経路の活性化が考えられるが、詳細なメカニズム解明には至っていない。ギャップ結合を構成する Cx43 の発現が電気刺激によって増加するという報告はなく、上述の細胞接着分子と併せ、細胞接着因子を介した細胞間コミュニケーションが、筋の分化・成熟および筋収縮に重要と考えられる。電気刺激と細胞間コミュニケーションについて、その細胞内シグナル伝達の下流も含め、今後さらに検討したい。また、本実験で使用した筋芽細胞は、ラット骨格筋由来のものであり、ヒト由来の細胞でも同様の結果が得られるか検証する必要がある。

筋本来の特性である「収縮能」のある筋線維まで、骨格筋由来の筋芽細胞を分化・成熟させた報告は他に例がなく、本システムを使った分化メカニズムの解明は、筋萎縮、筋ジストロフィー症、心疾患等の筋関連疾患に対する細胞レベルでの治療法開発へと発展する可能性がある。電気刺激による分化促進効果や収縮能の獲得に関するメカニズムをさらに詳細に検討し、電気刺激療法の EBM (evidence based medicine) のみならず、筋の再生医療研究へも応用していきたい。

第5章 結論

本研究では、培養筋芽細胞に断続的な電気刺激を行うことで、筋の分化が促進され、筋芽細胞は横紋をもった成熟した筋線維にまで分化し、さらに自動収縮能をもつ筋線維まで分化した。これまでに筋芽細胞（L6 細胞株）が収縮する報告はなく、電気刺激の効果を証明する知見である。

筋の分化マーカーを mRNA レベルとタンパク質レベルで解析し、電気刺激による筋分化促進効果を分子細胞生物学的にも明らかにした。特に、筋分化における最終段階に重要な myf-6 と M-カドヘリンのタンパク質発現が、電気刺激により増加した。

細胞膜活動電位の計測から、電気刺激を行った細胞にみられた収縮する細胞には、GJIC の存在する可能性が示唆され、電気刺激群では、ギャップ結合を構成する Cx43 が多数発現していることが分かった。

本研究で行った筋芽細胞に対する電気刺激は、細胞間コミュニケーションに関わる細胞接着因子（M-カドヘリン、 β_1 -インテグリン、Cx43）の発現を増加させた。電気刺激による筋分化促進メカニズムとして、細胞接着因子を介した細胞内シグナル伝達の活性化が示唆される。この点に着目して詳細に検討し、電気刺激療法の EBM の確立と筋の再生医療研究への応用につなげたい。

謝 辞

終わりに臨み，細胞膜活動電位測定に御協力ならびに御指導賜りました広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 探索医科学講座 心臓血管生理医学研究室 山岡 薫 助教授（現 広島国際大学 保健医療学部 理学療法学科 教授）に深く感謝申し上げます。また，本研究を遂行するにあたり，終始御支援頂きました弓削研究室の皆様に厚くお礼申し上げます。

1. Kawahara Y, Yamaoka K, Iwata M, Fujimura M, Kajiume T, Magaki T, Takeda M, Ide T, Kataoka K, Asashima M, Yuge L: Novel electrical stimulation sets the cultured myoblast contractile function to "on". *Pathobiology*, 73: 288-294, 2006.
2. Kawahara Y, Nikawa T, Hirasaka K, Miyashita T, Kataoka K, Yuge L: Preventive effect of isometric contraction exercise on disuse muscle atrophy using tail suspension mice. *Journal of Physical Therapy Science*, 20: 39-44, 2008.
3. Yuge L, Kajiume T, Tahara H, Kawahara Y, Umeda C, Yoshimoto R, Wu SL, Yamaoka K, Asashima M, Kataoka K, Ide T: Microgravity potentiates stem cell proliferation while sustaining the capability of differentiation. *Stem Cells Development*, 15: 921-929, 2006.
4. Kasaoka S, Kawahara Y, Inoue S, Tsuji M, Kato H, Tsuchiya T, Okuda H, Nakajima S: Gender effects in dietary histidine-induced anorexia. *Nutrition*, 21: 855-858, 2005.
5. Noda M, Kawahara Y, Ichikawa A, Matoba Y, Matsuo H, Lee DG, Kumagai T, Sugiyama M: Self-protection mechanism in D-cycloserine-producing *Streptomyces lavendulae*. Gene cloning, characterization, and kinetics of its alanine racemase and D-alanyl-D-alanine ligase, which are target enzymes of D-cycloserine. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 46143-46152, 2004.

引用文献

1. 吉田松生, 鍋島陽一: 筋細胞の決定・増殖・分化と MyoD ファミリー. 細胞工学, 14: 781-788, 1995.
2. 武田伸一, 宮越友子, 藤盛圭太: 骨格筋幹細胞と筋再生. Bio Clinica, 15: 36-40, 2000.
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Molecular Biology of the Cell; 4th ed: Garland Publishing. New York, 2002, pp 831-852.
4. Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA.: Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. Endocr Rev, 17: 481-517, 1996.
5. Hsu HH, Zdanowicz MM, Agarwal VR, Speiser PW.: Expression of myogenic regulatory factors in normal and dystrophic mice: effects of IGF-1 treatment. Biochem Mol Med, 60: 142-148, 1997.
6. Yuge L, Kataoka K: Differentiation of myoblasts is accelerated in culture in a magnetic field. In vitro Cell Dev Biol, 36: 383-386, 2000.
7. Rauch C, Loughna PT: Static stretch promotes MEF2A nuclear translocation and expression of neonatal myosin heavy chain in C2C12 myocytes in a calcineurin- and p38-dependent manner. Am J Physiol Cell Physiol, 288: C593-605, 2005.
8. Kurokawa K, Abe S, Sakiyama K, Takeda T, Ide Y, Ishigami K: Effects of stretching stimulation with different rates on the expression of MyHC mRNA in mouse cultured myoblasts. Biomed Res, 28: 25-31, 2007.
9. Hirasaka K, Nikawa T, Yuge L, Ishihara I, Higashibata A, Ishioka N, Okubo A, Miyashita T, Suzue N, Ogawa T, Oarada M, Kishi K: Clinorotation prevents differentiation of rat myoblastic L6 cells in association with reduced

- NF- κ B-signaling. *BBA-Molecular Cell Research*, 173: 130-140, 2005.
10. Kawahara Y, Nikawa T, Hirasaka K, Miyashita T, Yuge L: Preventive effect of isometric contraction exercise on disuse muscle atrophy using tail suspension mice. *Journal of Physical Therapy Science*, 20, 2007 in press
 11. Trimble MH, Enoka RM: Mechanisms underlying the training effects associated with neuromuscular electrical stimulation. *Phys Ther*, 71: 273-282, 1991.
 12. Rooney JG, Currier DP, Nitz AJ: Effect of variation in the burst and carrier frequency modes of neuromuscular electrical stimulation on pain perception of healthy subjects. *Phys Ther*, 72: 800-809, 1992.
 13. Cameron MH 編著 / 眞野行生・渡部一郎 監訳: EBM 物理療法 根拠・意思決定・臨床適応: 医歯薬出版. 東京, 2003, pp368-378.
 14. Wehrle U, Dusterhoft S, Pette D: Effects of chronic electrical stimulation on myosin heavy chain expression in satellite cell cultures derived from rat muscles of different fiber-type composition. *Differentiation*, 58: 37-46, 1994.
 15. Stern-Straeter J, Bach AD, Stangenberg L, Foerster VT, Horch RE, Stark GB, Beier JP: Impact of electrical stimulation on three-dimensional myoblast cultures - a real-time RT-PCR study. *J Cell Mol Med*, 9: 883-892, 2005.
 16. Pedrotty DM, Koh J, Davis BH, Taylor DA, Wolf P, Niklason LE: Engineering skeletal myoblasts: roles of three-dimensional culture and electrical stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288: H1620-1626, 2005.
 17. Clark EA, Brugge JS: Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*, 268: 233-239, 1995.
 18. Carson JA, Lei W: Integrin signaling's potential for mediating gene expression in hypertrophying skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 88: 337-343, 2000.

19. van der Flier A, Kuikman I, Baudoin C, van der Neut R, Sonnenberg A: A novel beta 1 integrin isoform produced by alternative splicing: unique expression in cardiac and skeletal muscle. *FEBS Lett*, 369: 340-344, 1995.
20. Belkin AM, Zhidkova NI, Balzac F, Altruda F, Tomatis D, Maier A, Tarone G, Koteliansky VE, Burridge K: Beta 1D integrin displaces the beta 1A isoform in striated muscles: localization at junctional structures and signaling potential in nonmuscle cells. *J Cell Biol*, 132:211-226, 1996.
21. Goichberg P, Shtutman M, Ben-Ze'ev A, Geiger B: Recruitment of beta-catenin to cadherin-mediated intercellular adhesions is involved in myogenic induction. *J Cell Sci*, 114: 1309-1319, 2001.
22. Kramerova I, Kudryashova E, Wu B, Spencer MJ: Regulation of the M-cadherin-beta-catenin complex by calpain 3 during terminal stages of myogenic differentiation. *Mol Cell Biol*, 26: 8437-8447, 2006.
23. Charrasse S, Meriane M, Comunale F, Blangy A, Gauthier-Rouviere C: N-cadherin-dependent cell-cell contact regulates Rho GTPases and beta-catenin localization in mouse C2C12 myoblasts. *J Cell Biol*, 158: 953-965, 2002.
24. Charrasse S, Comunale F, Grumbach Y, Poulat F, Blangy A, Gauthier-Rouviere C: RhoA GTPase regulates M-cadherin activity and myoblast fusion. *Mol Biol Cell*, 17: 749-759, 2006.
25. Bershadsky AD, Balaban NQ, Geiger B: Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19: 677-695, 2003.
26. Mobasheri A, Carter SD, Martín-Vasallo P, Shakibaei M: Integrins and stretch activated ion channels: putative components of functional cell surface mechanoreceptors in articular chondrocytes. *Cell Biol Int*, 26: 1-18, 2002.

27. Shyy JY, Chien S.: Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress. *Circ Res*, 91: 769-775, 2002.
28. 中村桂子, 松原謙一 監訳: 細胞の分子生物学 第4版, 細胞結合, 細胞接着, 細胞外マトリックス: ニュートンプレス, 東京, 2004, pp1065-1125.
29. <http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/dbs01/re-paper-temp.php?id=20>
30. http://www.cdb.riken.jp/jp/millennium/1_1.html
31. Proulx A, Merrifield PA, Naus CG: Blocking gap junctional intercellular communication in myoblasts inhibits myogenin and MRF4 expression. *Dev Genet*, 20: 133-144, 1997.
32. Constantin B, Cronier L: Involvement of gap junctional communication in myogenesis. *Int Rev Cytol*, 196: 1-65, 2000.
33. Constantin B, Cronier L, Raymond G: Transient involvement of gap junctional communication before fusion of newborn rat myoblasts. *C R Acad Sci III*, 320: 35-40, 1997.
34. Yaffe D: Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 61: 477-483, 1968.
35. Gundersen GG, Khawaja S, Bulinski JC: Generation of a stable, posttranslationally modified microtubule array is an early event in myogenic differentiation. *J Cell Biol*, 109: 2275-2288, 1989.
36. Zammit PS, Beauchamp JR: The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell?. *Differentiation*, 68: 193-204, 2001.
37. Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN, Klein WH: Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature*, 364: 501-506, 1993.
38. Zhu Z, Miller JB: MRF4 can substitute for myogenin during early stages of

- myogenesis. *Dev Dyn*, 209: 233-241, 1997.
39. Hinterberger TJ, Sassoon DA, Rhodes SJ, Konieczny SF: Expression of the muscle regulatory factor MRF4 during somite and skeletal myofiber development. *Dev Biol*, 147: 144-156, 1991.
 40. Nicolas N, Mira JC, Gallien CL, Chanoine C: Localization of Myf-5, MRF4 and alpha cardiac actin mRNAs in regenerating *Xenopus* skeletal muscle. *C R Acad Sci III*, 321: 355-364, 1998.
 41. Donalies M, Cramer M, Ringwald M, Starzinski-Powitz A: Expression of M-cadherin, a member of the cadherin multigene family: correlates with differentiation of skeletal muscle cells. *Proc Nat Acad Sci USA*, 88: 8024-8028, 1991.
 42. Rose O, Rohwedel J, Reinhardt S, Bachmann M, Cramer M, Rotter M, Wobus A, Starzinski-Powitz S: Expression of M-cadherin protein in myogenic cells during prenatal mouse development and differentiation of embryonic stem cell in culture. *Dev Dynam*, 201: 245-259, 1994.
 43. Zeschnigk M, Kozian D, Kuch C, Schmoll M, Starzinski-Powitz A: Involvement of M-cadherin in terminal differentiation of skeletal muscle cells. *J Cell Sci*, 108: 2973-2981, 1995.
 44. Polesskaya A, Seale P, Rudnicki MA: Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell*, 27: 841-852, 2003.
 45. Seale P, Polesskaya A, Rudnicki MA: Adult stem cell specification by Wnt signaling in muscle regeneration. *Cell Cycle*, 2: 418-419, 2003.
 46. Balogh S, Naus CG, Merrifield PA: Expression of gap junctions in cultured rat L6 cells during myogenesis. *Dev Biol*, 155: 351-360, 1993.

47. Gorbe A, Becker DL, Dux L, Stelkovic E, Krenacs L, Bagdi E, Krenacs T: Transient upregulation of connexin43 gap junctions and synchronized cell cycle control precede myoblast fusion in regenerating skeletal muscle *in vivo*. *Histochem Cell Biol*, 123: 573-583, 2005.
48. Araya R, Eckardt D, Maxeiner S, Krüger O, Theis M, Willecke K, Sáez JC: Expression of connexins during differentiation and regeneration of skeletal muscle: functional relevance of connexin43. *J Cell Sci*, 118: 27-37, 2005.
49. Czyz J, Guan K, Zeng Q, Wobus AM: Loss of beta 1 integrin function results in upregulation of connexin expression in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Int J Dev Biol*, 49: 33-41, 2005.
50. Matsuda T, Fujio Y, Nariai T, Ito T, Yamane M, Takatani T, Takahashi K, Azuma J: N-cadherin signals through Rac1 determine the localization of connexin 43 in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 40: 495-502, 2006.
51. Yuge L, Okubo A, Miyashita T, Kumagai T, Nikawa T, Takeda S, Kanno M, Urabe Y, Sugiyama M, Kataoka K: Physiol stress by magnetic force accelerates differentiation of human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 311: 32-38, 2003.
52. Yuge L, Hide I, Kumagai T, Kumei Y, Takeda S, Kanno M, Sugiyama M, Kataoka K: Cell differentiation and p38MAPK cascade are inhibited in human osteoblasts cultured in a 3D-clinostat. *In Vitro Cell Dev Biol-Animal*, 39: 89-97, 2003.
53. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143-147, 1999.
54. Caplan AI, Bruder SP: Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular

- medicine in the 21st century. *Trends Mol Med*, 7: 259-264, 2001.
55. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P: Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *New Engl J Med*, 344: 1750–1757, 2001.
56. Murry CE, Whitney ML, Reinecke H: Muscle cell grafting for the treatment and prevention of heart failure. *J Card Fail*, 8: S532-541, 2002.
57. Eisenberg LM, Eisenberg CA: Adult stem cells and their cardiac potential. *Anat Rec A*, 276A: 103-112, 2004.
58. Gojo S, Gojo N, Takeda Y, Mori T, Abe H, Kyo S, Hata J, Umezawa A: *In vivo* cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*, 288: 51-59, 2003.
59. Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, Yoshihara T, Hoshino M, Takeda S, Ide C, Nabeshima Y: Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science*, 309: 314-317, 2005.
60. Muguruma Y, Reyes M, Nakamura Y, Sato T, Matsuzawa H, Miyatake H, Akatsuka A, Itoh J, Yahata T, Ando K, Kato S, Hotta T: *In vivo* and *in vitro* differentiation of myocytes from human bone marrow-derived multipotent progenitor cells. *Exp Hematol*, 31: 1323-1330, 2003.
61. Schulze M, Bedada FB, Technau A, Braun T: Mesenchymal stem cells are recruited to striated muscle by NFAT/IL-4-mediated cell fusion. *Genes Dev*, 19: 1787-1798, 2005.
62. Bhagavati S, Xu W: Isolation and enrichment of skeletal muscle progenitor cells from mouse bone marrow. *Biochem Biophys Res Commun*, 318: 119-124, 2004.

63. Yuge L, Kajiume T, Tahara H, Kawahara Y, Umeda C, Yoshimoto R, Wu SL, Yamaoka K, Asashima M, Kataoka K, Ide T: Microgravity potentiates stem cell proliferation while sustaining the capability of differentiation. *Stem Cells Dev*, 15: 921-929, 2006.
64. Kawahara Y, Yamaoka K, Iwata M, Fujimura M, Kajiume T, Magaki T, Takeda M, Ide T, Kataoka K, Asashima M, Yuge L: Novel electrical stimulation sets the cultured myoblast contractile function to "on". *Pathobiology*, 73: 288-294, 2006.
65. Knight MM, Toyoda T, Lee DA, Bader DL: Mechanical compression and hydrostatic pressure induce reversible change in actin cytoskeletal organisation in chondrocytes in agarose. *J Biomech*, 39: 1547-1551, 2006.
66. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE: Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126: 677-689, 2006.