

原著論文

受付：2012. 9.21

受理：2013. 1.17

電気刺激による培養骨格筋細胞の肥大効果

岩田 全 広

日本福祉大学 健康科学部
名古屋大学大学院 医学系研究科

西 浜 かすり

医療法人 三仁会 あさひ病院 リハビリテーション科

土 田 和可子

日本福祉大学 健康科学部 実習教育センター

鈴 木 重 行

名古屋大学大学院 医学系研究科

The Hypertrophic Effect of Electrical Pulse Stimulation
on Cultured Skeletal Muscle Cells

Masahiro Iwata

Faculty of Health Sciences, Nihon Fukushi University
Program in Physical and Occupational Therapy, Graduate School of Medicine, Nagoya University

Kasuri Nishihama

Department of Rehabilitation, Asahi Hospital

Wakako Tsuchida

Nihon Fukushi University, Faculty of Health Sciences, Practical Education Center

Shigeyuki Suzuki

Program in Physical and Occupational Therapy, Graduate School of Medicine, Nagoya University

Abstract: Electrical pulse stimulation (EPS) has a hypertrophic effect on mammalian skeletal muscle, and it is usually used to prevent muscle atrophy and improve muscle strength during rehabilitation therapy. However, there is no clear explanation for the mechanisms of how EPS induces muscle hypertrophy. Thus, to clarify the mechanisms, we performed cell culture of skeletal myotubes (C2C12 myotubes). This culture was stimulated for 3 days, and the morphology of the hypertrophied myotube was analyzed. EPS conditions were as follows: rectangular wave; pulse frequency, 1.0 Hz; pulse duration, 2.5 msec; voltage, 50 V; and stimulation time, 5 min/h. Accordingly, observation under a microscope revealed that fully differentiated C2C12 myotubes contracted synchronously by EPS. In addition, diameters of the myotubes, taking as indicators of muscle hypertrophy, were analyzed. Diameters of the stimulated cells were significantly increased, compared to the diameters of those that were not stimulated. These results suggest that EPS induces to the hypertrophy of the C2C12 myotubes.

Keywords: 電気刺激, 筋肥大, 培養骨格筋細胞, C2C12 筋管細胞

1. はじめに

筋力増強は、長期臥床や神経疾患あるいは骨関節疾患により生じた筋力低下を改善し、運動機能を向上させ、activities of daily living (ADL) の改善を図ることができる。筋力は筋断面積と相関する¹⁾ことから、筋力増強は筋断面積の増大、つまり筋肥大に寄与するところが大きいと言われている。そのため、リハビリテーション医療の現場では、筋肥大を引き起こす刺激として、負荷運動やストレッチングあるいは、物理療法の中でも電気刺激などが施行されている。電気刺激は心肺機能へ負担をかけずに筋収縮を引き起こすことができる²⁾。したがって、筋力増強を目的とした電気刺激は、高齢者³⁾、心血管疾患²⁾、呼吸器疾患^{4,5)}などの症例に対して有効な手段となり得る。

電気刺激による筋力増強の報告はこれまで多くなされており、2~6週間の刺激期間により数%~30%程度の増強効果があるとされている^{6,7)}。また、in vivoの実験において、ラット腓腹筋への電気刺激で筋肥大効果が得られ、筋線維横断面積の増加、筋湿重量の増加、筋構成タンパク質の合成の増加が生じることが明らかにされている^{8,9)}。これらのことから、筋肥大に有効な電気刺激を与えることは筋萎縮の予防・改善や筋力増強につながると考えられるが、電気刺激がどのようなメカニズムを介して筋肥大を促すのかは、まだ十分に解明されていないのが現状である。その理由として、ヒトや動物を用いた実験では、筋と神経の因子を分けて検討することや、栄養摂取の調整が難しいことなどが挙げられる。これらの点で電気刺激による筋肥大メカニズムの解明には培養細胞を用いる実験の方が有利であると考えられる。

そこで本研究では、電気刺激による筋肥大メカニズムを解明する第一歩として、培養骨格筋細胞 (C2C12 筋管細胞) に電気刺激を与え、その筋肥大効果について形態学的に検討した。

2. 材料と方法

2.1 細胞の種類と培養方法

実験には、マウス骨格筋由来の筋芽細胞株 C2C12 細胞¹⁰⁾を使用した。この細胞は哺乳類の細胞であり、また、細胞樹立株であるため継代が可能で安定した増殖能を有し、大量培養することも比較的容易であり、性質が比較的一定している。

培養液は、15%牛胎児血清 (Life Technologies)

含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (以下、DMEM) (Sigma-Aldrich) もしくは、5%馬血清 (Life Technologies) 含有 DMEM を用いた。実験に際しては、15%牛胎児血清含有 DMEM を用い、0.5 mg/ml に調整した I 型コラーゲン溶液 (高研, IAC-50) で薄層コーティングを施した細胞培養皿 (日本 BD, 60 × 15 mm dish) に、 7×10^3 個/cm² の密度で播種した。細胞密度は、播種後 2 日目には単核の筋芽細胞が増殖して培養皿底面の 9 割程度を覆う状態に達し、この時点で 5%馬血清含有 DMEM に交換した。播種後 7 日目には多数の筋管細胞が位相差顕微鏡下で観察できた。分化誘導中、細胞は 37 °C、5.0% CO₂ 環境下で培養した。分化誘導期間中の培養液の交換は、2 日に 1 回の頻度で行った。

2.2 電気刺激の方法

電気刺激は Wehrle ら¹¹⁾の方法に従い、電気刺激装置 (日本光電, SEN-7203) と電気刺激用培養皿 (培養皿の蓋に電極となるプラチナピンを 2 本通したもの) を用いた。

今回の研究で用いる電気刺激の至適条件を決定する目的で、周波数 (0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 Hz) および、電圧 (10, 20, 30, 40, 50 V) を変化させた際の筋管細胞の直径を計測し、細胞の電気刺激に対する周波数特性と電圧特性を求めた。対象は、播種後 7 日目の筋管細胞とし、37 °C、5.0% CO₂ 環境下で電気刺激を与えた。なお、出力波形は矩形波とし、パルス持続時間 2.5 msec、刺激時間 5 分/時間、刺激期間 3 日間とした。

次に、submaximum (周波数 1.0 Hz、電圧 50 V、パルス持続時間 2.5 msec) の電気刺激を与えた際の筋管細胞の直径を計測し、電気刺激の最大効果を求めた。実験群は、播種後 7 日目の筋管細胞に対して 37 °C、5.0% CO₂ 環境下で電気刺激を与えた電気刺激群、同期間に電気刺激を与えず通常培養した対照群、の 2 群とした。

電気刺激期間中の培養液の交換は、24 時間に 1 回の頻度で行った。

2.3 形態学的検索

電気刺激終了後、ギムザ染色を施し、以下に示す方法で細胞直径を計測した。

位相差顕微鏡下に無作為に細胞培養皿を置き、その時に観察された視野とその周囲を顕微鏡用デジタルカメラ (Nikon, DXM1200F) で撮影し、その撮影画像をパソコンに取り込んだ。パソコンに取り込んだ撮影画像は、画像編集アプリケーションソフト (Adobe System, Adobe® Photoshop® CS5) を用いて合成し、合成画像内に全長が写っている全ての筋管細胞の直径を計測した。直径の計測は、Stitt ら¹²⁾の報告を参考に、50 μm 間隔のスケールを作製し、このスケールを筋管細胞の長軸方向に重ね、筋管細胞が最も太く観察される部分とその両側 50 μm 部分の計 3 箇所を直径を計測した。そして、3 箇所を平均値を算出し、これを筋管細胞の肥大の指標とした。また、細胞直径の分布状況をヒストグラムで表示し、両群の分布を比較した。なお、計測した細胞数は、周波数特性と電圧特性を求めた実験では各条件とも 20 本以上、電気刺激の最大効果を求めた実験では各群とも 100 本以上であった。

2.4 統計処理

得られた結果は、平均値 \pm 標準偏差で表した。対照群と電気刺激群の細胞直径の比較には対応のない t 検定 (Welch's t-test) を用いて、両群間に有意差が存在するかどうかを判定した。また、細胞直径の分布状況については ² 検定を用いて、両群間に有意差が存在するかどうかを判定した。なお、全ての統計手法とも有意水準は 5% 未満とした。

3. 結果

3.1 周波数 - 反応曲線

図 1 A に、電圧を 40 V に固定して筋管細胞を電気刺激した際の周波数 - 反応曲線を示した (0 Hz : n = 23, 0.25 Hz : n = 26, 0.5 Hz : n = 25, 1.0 Hz : n = 25, 2.0 Hz : n = 29, 4.0 Hz : n = 27)。細胞直径は周波数の増加とともに増大し、1.0 Hz で最大となり、以後減少した。

3.2 電圧 - 反応曲線

図 1 B に、周波数を 1.0 Hz に固定して筋管細胞を電気刺激した際の電圧 - 反応曲線を示した (0 V : n = 27, 10 V : n = 25, 20 V : n = 29, 30 V : n = 28, 40 V : n = 24, 50 V : n = 27)。細胞直径は電圧の増加とともに増大し、40 V でほぼプラトーに達し、以後 50 V まで維持された。

3.3 電気刺激による筋管細胞の収縮と肥大効果

周波数 - 反応曲線および、電圧 - 反応曲線の結果から、電気刺激の至適条件を submaximum として周波数 1.0 Hz、電圧 50 V、パルス持続時間 2.5 msec とした。播種後 7 日目の筋管細胞に対して submaximum の電気刺激を与えたところ、60 ~ 80% 程度の筋管細胞が電気刺激に応じて収縮する様子が位相差顕微鏡下で観察された。

図 2 A と B に、電気刺激終了後の各群のギムザ染色像を示した。両群を位相差顕微鏡で検鏡したところ、電気刺激群の筋管細胞 (図 2 B) は対照群の筋管細胞

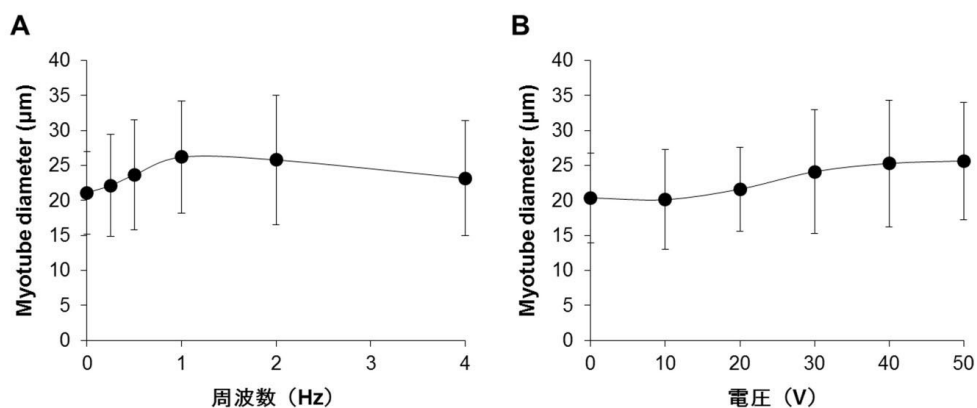


図 1 筋管細胞の電気刺激に対する周波数特性と電圧特性

A は電圧を 40 V に固定し、周波数を 4.0 Hz まで増加させて、細胞を電気刺激した際の周波数 - 反応曲線、B は周波数を 1.0 Hz に固定し、電圧を 50 V まで増加させて、細胞を電気刺激した際の電圧 - 反応曲線である。

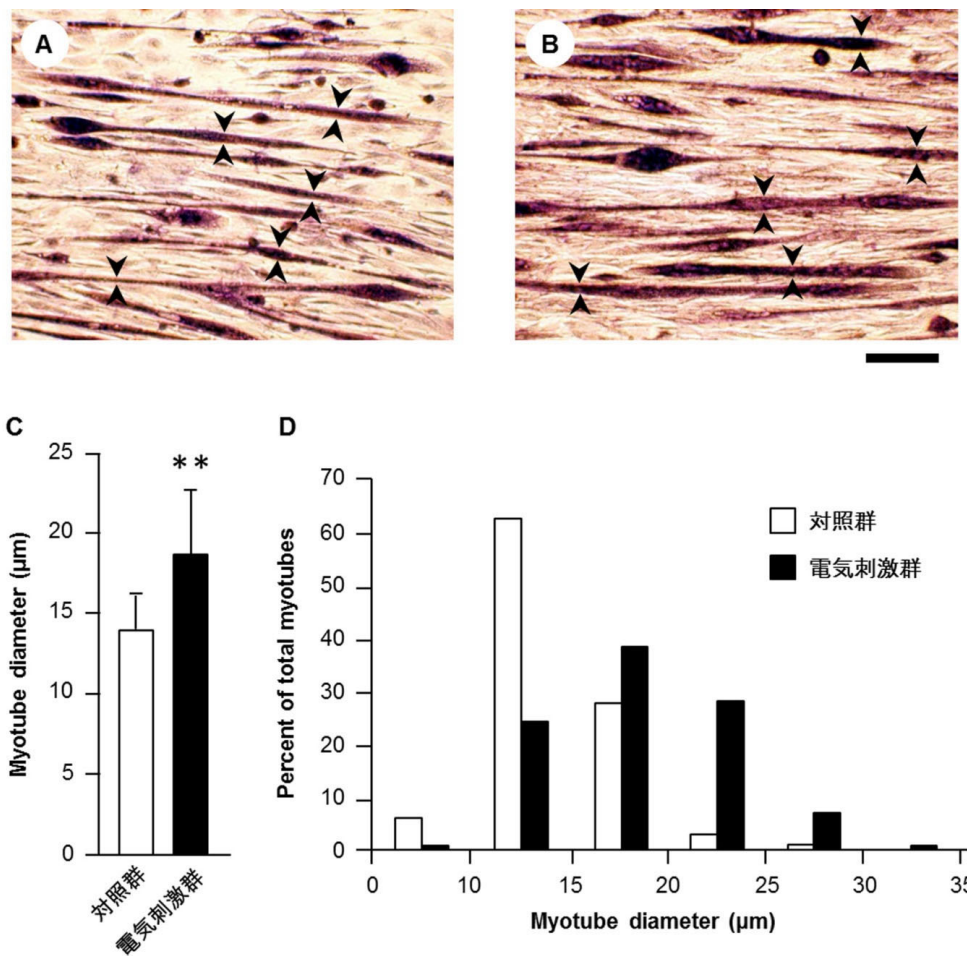


図2 電気刺激による筋管細胞の肥大効果

Aは電気刺激を与えていない細胞（対照群），Bは電気刺激を与えた細胞（電気刺激群）のギムザ染色像である。矢じりで示した箇所が筋管細胞の直径である。スケールは100 μmを示す。
 Cは各群の細胞直径の平均値±標準偏差である。**は対照群との有意差（ $P < 0.01$ ）を示す。
 Dは各群の細胞直径の分布状況（ヒストグラム）である。横軸は細胞直径を5 μm毎に区切った値，縦軸は区切られた範囲の直径をもつ細胞数が総細胞数に占める割合（%）を示す。

（図2A）と比較して，太く観察された。

図2Cに，各群の細胞直径の平均値を示した。電気刺激群の細胞直径の平均値（ $18.3 \pm 4.4 \mu\text{m}$, $n = 139$ ）は対照群のそれ（ $14.1 \pm 2.9 \mu\text{m}$, $n = 158$ ）と比較して，有意に高値を示した（ $t_{242} = 8.844$, $P < 0.01$ ）。

図2Dに，各群の細胞直径の分布状況（ヒストグラム）を示した。電気刺激群と対照群の細胞直径の分布は，それぞれ直径範囲0~10 μmでは0.7%，5.7%，直径範囲10~15 μmでは24.5%，62.7%，直径範囲15~20 μmでは38.1%，27.8%，直径範囲20~25 μmでは28.8%，3.2%，直径範囲25~30 μmでは7.2%，0.6%，直径範囲30~35 μmでは0.7%，0%であり，両群の分布に有意な差がみられた（ $\chi^2(5) = 49.015$,

$P < 0.01$ ）。すなわち，対照群では細胞直径が10~15 μmのものが最も多く占めているのに対し，電気刺激群では15~20 μmのものが最も多く占めていた。また，25 μm以上の直径をもつ細胞の分布に注目すると，対照群では0.6%であるのに対して，電気刺激群では7.9%とより大きな直径をもつ細胞の分布が顕著であった。

4. 考察

本研究では，播種後7日目のC2C12筋管細胞に対して submaximum（周波数1.0 Hz，電圧50 V，パルス持続時間2.5 msec）の電気刺激を与えたところ，電気刺激に応じて収縮する様子が観察された。また，

submaximum の電気刺激を 3 日間与えた後、筋肥大の指標として細胞直径を計測したところ、電気刺激を与えた細胞の直径は電気刺激を与えなかったそれより有意に増加したことから、電気刺激により C2C12 筋管細胞は肥大することが示唆された。

われわれは電気刺激による C2C12 筋管細胞の肥大効果を評価するために、*in vitro* におけるストレッチングの筋肥大効果について詳細に報告した Adachi ら¹³⁾の形態学的検索法を参考にして、C2C12 筋管細胞の直径の分布状況をヒストグラムで表示することを試みた。今回得られたヒストグラムの特徴として、対照群に比べ電気刺激群のヒストグラムは、ピーク値が右方に変位する（電気刺激により太い細胞数が増加する）とともに、分布幅が拡大した（対照群では認められない太さの細胞が観察された）。この特徴は Adachi ら¹³⁾の解析結果と類似しており、*in vitro* においても電気刺激が筋肥大をもたらしたことを示唆している。基本的に骨格筋の肥大はミオシン、アクチン、トロポニンなどの収縮装置を構成するタンパク質や、エネルギー産生、代謝にかかわるすべてのタンパク質が増加することである。これまで神経系からの分泌物質や内分泌系のホルモンがなんらかの機構で筋細胞に作用し、収縮装置成分を増加させることが示唆されてきた¹⁴⁻¹⁶⁾。しかしながら近年、除神経やホルモンの分泌抑制などにより神経系や内分泌系の影響を排除してもストレッチングや代償性過負荷によって筋が肥大することから、筋肥大には神経系因子や内分泌系因子は必須ではないと考えられている^{17, 18)}。本研究においても、実験対象に神経系因子や内分泌系因子の影響を排除できる培養細胞を用いて電気刺激を与えた結果、C2C12 筋管細胞の肥大が認められた。これは上述した所見を支持する結果である。

C2C12 筋管細胞の肥大をもたらした電気刺激効果のメカニズムとしては、電気刺激による「収縮」および、それに伴う「張力発揮（メカニカルストレス）」の関与が考えられる。通常、筋細胞が収縮した場合、細胞は受動的に伸張されるため、筋細胞には常にメカニカルストレスが加わっている。筋収縮がタンパク質の合成を促進し、筋肥大をもたらすことは周知の事実であるが、近年、収縮に伴うメカニカルストレスそのものが筋肥大を引き起こす重要な因子であることがわかってきた¹⁸⁾。例えば、Vandenburgh ら¹⁹⁾は伸張可能なシリコン膜上に骨格筋細胞を培養し、シリコン膜ごと伸張することにより細胞

にメカニカルストレスを与えた際、筋肥大が生じることを報告している。また、心筋細胞では、メカニカルストレスを感知する装置として機械受容チャネルが見つまっている²⁰⁾。これらは細胞内情報伝達系を活性化することにより、遺伝子の発現や筋構成タンパク質の合成を促進し、筋肥大を促すと考えられている。したがって、電気刺激による C2C12 筋管細胞の肥大メカニズムとしては、今回の結果だけでは断言できないものの、収縮に伴って C2C12 筋管細胞に加わるメカニカルストレスが遺伝子の発現や筋構成タンパク質の合成を促進し、肥大を引き起こしたと推察される。

一方、成長因子のひとつであるインスリン様成長因子 (insulin-like growth factor 1: 以下、IGF-1) によっても筋は肥大する。たとえば、負荷運動やストレッチングにより筋細胞自身が IGF-1 を分泌し、その IGF-1 が autocrine (自己分泌) もしくは、paracrine (傍分泌) により自身のタンパク質合成を促進して筋肥大を引き起こすことが既に提唱されており^{21, 22)}、電気刺激によっても筋細胞が IGF-1 遺伝子を発現する^{23, 24)}ことや、IGF-1 遺伝子の発現では 2 種類の mRNA が生じる^{23, 24)}ことも報告されている。したがって、電気刺激は IGF-1 の分泌を促して筋肥大を引き起こしたと考えられるが、実際に、電気刺激により筋細胞が分泌した IGF-1 を検出した例は乏しく、筋肥大につながるという報告はまだない。今回認められた電気刺激による筋肥大効果に、成長因子 (IGF-1) がどの程度関与しているかは今後検討しなければならない課題である。

これまで *in vitro* における電気刺激の筋肥大効果について詳細に検討した報告はなかったが、今回得られた結果から電気刺激に応じて C2C12 筋管細胞が収縮し、肥大することが明らかとなった。しかし、そのメカニズムの解明にはまだ至っていない。今後、電気刺激による筋肥大メカニズムを解明し、筋力増強、筋力低下の予防を目的とした科学的根拠に基づく理学療法の実用化につなげていきたい。

5. 結語

今回、C2C12 筋管細胞に 3 日間の電気刺激を与え、その筋肥大効果について形態学的に検討した。その結果、播種後 7 日目の C2C12 筋管細胞では、電気刺激に応じた収縮が認められた。電気刺激終了後、細胞直径を計測したところ、電気刺激を与えた細胞の直径は電気刺激を

与えなかったそれより有意に増加した。以上の結果より、電気刺激により C2C12 筋管細胞は肥大することが示唆された。

謝辞

本研究の一部は、文部科学省科学研究費若手研究(B) (課題番号 24700567, 24700568), 日本福祉大学健康科学研究所(公募型研究プロジェクト)ならびに、エイキット株式会社による助成を受けて実施されたものである。

引用文献

- 1) M. V. Narici, L. Landoni, A. E. Minetti: Assessment of human knee extensor muscle stress from in vivo physiological cross-sectional area and strength measurements. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 65, pp. 438-444 (1992)
- 2) J. F. Maillefert, J. C. Eicher, P. Walker, V. Du-lieu, I. Rouhier-Marcet, F. Branly, M. Cohen, F. Brunotte, J. E. Wolf, J. M. Casillas, J. P. Didier: Effects of low-frequency electrical stimulation of quadriceps and calf muscles in patients with chronic heart failure. *J Cardiopulm Rehabil*, 18, pp. 277-282 (1998)
- 3) E. Caggiano, T. Emrey, S. Shirley, R. L. Craik: Effects of electrical stimulation or voluntary contraction for strengthening the quadriceps femoris muscles in an aged male population. *J Orthop Sports Phys Ther*, 20, pp. 22-28 (1994)
- 4) N. Ambrosino, S. Strambi: New strategies to improve exercise tolerance in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 24, pp. 313-322 (2004)
- 5) E. Zanotti, G. Felicetti, M. Maini, C. Fracchia: Peripheral muscle strength training in bed-bound patients with COPD receiving mechanical ventilation: effect of electrical stimulation. *Chest*, 124, pp. 292-296 (2003)
- 6) D. P. Currier, J. Lehman, P. Lightfoot: Electrical stimulation in exercise of the quadriceps femoris muscle. *Phys Ther*, 59, pp. 1508-1512 (1979)
- 7) J. A. Balogun, O. O. Onilari, O. A. Akeju, D. K. Marzouk: High voltage electrical stimulation in the augmentation of muscle strength: effects of pulse frequency. *Arch Phys Med Rehabil*, 74, pp. 910-916 (1993)
- 8) K. Inoue, S. Yamasaki, T. Fushiki, Y. Okada, E. Sugimoto: Androgen receptor antagonist suppresses exercise-induced hypertrophy of skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 69, pp. 88-91 (1994)
- 9) K. Baar, K. Esser: Phosphorylation of p70S6k correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. *Am J Physiol*, 276, pp. C120-C127 (1999)
- 10) M. Iwata, S. Suzuki, K. Hayakawa, T. Inoue, K. Naruse: Uniaxial cyclic stretch increases glucose uptake into C2C12 myotubes through a signaling pathway independent of insulin-like growth factor I. *Horm Metab Res*, 41, pp. 16-22 (2009)
- 11) U. Wehrle, S. Dusterhoft, D. Pette: Effects of chronic electrical stimulation on myosin heavy chain expression in satellite cells cultures derived from rat muscles of different fiber-type composition. *Differentiation*, 58, pp. 37-46 (1994)
- 12) T. N. Stitt, D. Drujan, B. A. Clarke, F. Panaro, Y. Timofeyeva, W. O. Kline, M. Gonzalez, G. D. Yancopoulos, D. J. Glass: The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell*, 14, pp. 395-403 (2004)
- 13) R. Adachi, K. Yabusaki, T. Obinata: Uptake of albumin is coupled with stretch-induced hypertrophy of skeletal muscle cells in culture. *Zoolog Sci*, 20, pp. 557-565 (2003)
- 14) O. E. Rooyackers, K. S. Nair: Hormonal regulation of human muscle protein metabolism. *Annu Rev Nutr*, 17, pp. 457-485 (1997)
- 15) K. Inoue, S. Yamasaki, T. Fushiki, Y. Okada, E. Sugimoto: Androgen receptor antagonist suppresses exercise-induced hypertrophy of skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 69, pp. 88-91 (1994)

- 16) K. L. Herbst, S. Bhasin: Testosterone action on skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 7, pp. 271-277 (2004)
- 17) A. L. Goldberg, J. D. Etlinger, D. F. Goldspink, C. Jablecki: Mechanism of work-induced hypertrophy of skeletal muscle. *Med Sci Sports*, 7, pp. 185-198 (1975)
- 18) 後藤勝正：ストレスと筋力の増強，筋力をデザインする．吉岡利忠，後藤勝正，石井直方（編），杏林書院，pp. 50-64 (2003)
- 19) H. Vandenburg, S. Kaufman: In vitro model for stretch-induced hypertrophy of skeletal muscle. *Science*, 203, pp. 265- 268 (1979)
- 20) J. Sadoshima, T. Takahashi, L. Jahn, S. Izumo: Roles of mechano-sensitive ion channels, cytoskeleton, and contractile activity in stretch-induced immediate-early gene expression and hypertrophy of cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci*, 89, pp. 9905-9909 (1992)
- 21) G. R. Adams: Invited Review: Autocrine/paracrine IGF-I and skeletal muscle adaptation. *J Appl Physiol*, 93, pp. 1159-1167 (2002)
- 22) V. Owino, S. Y. Yang, G. Goldspink: Age-related loss of skeletal muscle function and the inability to express the autocrine form of insulin-like growth factor-1 (MGF) in response to mechanical overload. *FEBS Lett*, 505, pp. 259-263 (2001)
- 23) G. McKoy, W. Ashley, J. Mander, S. Y. Yang, N. Williams, B. Russell, G. Goldspink: Expression of insulin growth factor-1 splice variants and structural genes in rabbit skeletal muscle induced by stretch and stimulation. *J Physiol*, 516, pp. 583-592 (1999)
- 24) G. R. Adams, D. C. Cheng, F. Haddad, K. M. Baldwin: Skeletal muscle hypertrophy in response to isometric, lengthening, and shortening training bouts of equivalent duration. *J Appl Physiol*, 96, pp. 1613-1618 (2004)