The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	C2C12細胞膜電位による分化判定と活性の評価
Author(s)	大西, 優貴; 川北, 悠介; 山崎, 健一 他
Citation	電気材料技術雑誌. 2008, 17, p. 38-43
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/76849
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

電気材料技術雑誌　第17巻第１号
J. Soc. Elect. Mat. Eng.　Vol.17,　No.1　２００８

C2C12 細胞膜電位による分化判定と活性の評価

大西　優貴，川北　悠介，山﨑　健一，藤里　俊哉，宇戸　禎仁

大阪工業大学大学院工学研究科生体医工学専攻
〒535-8585　大阪府大阪市旭区大宮 5-16-1

Evaluation of a Cellular Differentiation and a Contraction of C2C12 by Cellular Membrane Potential.

Yuki OHNISHI, Yusuke KAWAKITA, Kenichi YAMASAKI, Toshia FUJISATO and SadahitoUTO
Department of Biomedical Engineering, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology
5-16-1 Omiya, Asahi-ku, Osaka 535-8585, Japan

Today, application of a cultured muscle to medical engineering has attracted much attention. For that, both to control C2C12 myoblast differentiation and to investigate a contraction mechanism of C2C12 myotube are important. The cultured muscle can be derived from a cultured C2C12 myoblast in an incubator, so that it is important to evaluate a progress of C2C12 differentiation quantitatively. In this study, we proposed an efficient evaluation method by cellular membrane potential measurement instead of conventional methods. Both costs and time will be saved by the new method.

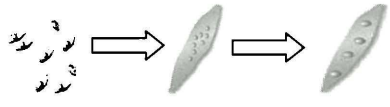
キーワード：C2C12 細胞，細胞膜電位，分化
Keywords：C2C12, cellular membrane potential, cellular differentiation

1.　はじめに

近年，再生医療の研究が進み，様々な生体組織の培養技術が開発されている．筋組織の培養も可能となり，しなやかな動きをもつ次世代アクチュエータの開発や筋疾患の治療を目指した培養筋肉の医工学応用が注目を集めている．培養筋細胞の医工学応用の研究においては，細胞の分化を制御することが重要となる[1]．分化を制御するうえで分化の進行度を定量的に判定する技術が大切であり，分化マーカーとなる蛋白質の発現を調べる方法は非常に有効であるが，必要とする細胞数が多く，コストや時間がかかる．さらに 3 次元培養では，顕微鏡下での細胞形態の判断が難しく，蛋白質を調べる場合も培養している細胞全てを取り出す必要があり，経時的に分化の状態を評価することが困難であり，形態観察以外の手法が必要になる．そこで低侵襲で経時的に細胞の分化を判定出来る技術が必要と考え細胞膜電位の計測を提案した．

筋肉を構成する筋細胞は，直径 10～100μm，長さ数 cm の巨大なシリンダー状の多核細胞である．細胞内には筋の特性である収縮運動を担う収縮構造が発達しており，筋細胞の興奮時(収縮)にカルシウムイオンを細胞質内へ放出する．また細胞膜は，神経細胞の場合と同様，電気的な興奮性を持つ[2]．

この筋細胞は，未分化な分裂能力のある単核の筋芽細胞が増殖を繰り返した後に分化を開始し筋管細胞を形成する．そして成熟すると横紋収縮構造をもつ多核筋細胞へ分化する[3]．この筋芽細胞から筋細胞への分化を図 1 に示す．



(a)　(b)　(c)

図 1　筋芽細胞の分化　(a)筋芽細胞 (b)筋管細胞 (c)筋細胞
Fig.1 Differentiation of myoblast. (a) myoblast (b) myotube (c) muscle cell

そこで本研究では，筋芽細胞の筋管細胞への分化を定量的に判定することが出来，且つ，分化後の筋管細胞の特性を電気的に評価することを可能とする細胞膜電位計測を応用した新しい判定技術の開発を行っている．

細胞膜電位とは，細胞膜の内側空間と外側空間の電位差である．細胞外空間は，Na^+が多く，細胞内空間ではK^+が多く存在する．細胞膜上には K^+のみを通す K^+チャネルと Na^+-K^+ポンプが存在する．静止状態の細胞では，K^+チャネルが常時開いている．このために細胞内から細胞外に向かい K^+の流出が起こる．この流出により細胞外は，正電荷が過剰になり，細胞内は，負電荷が過剰になって，細胞内外に電荷の不均等分布が発生する．そして Na^+-K^+ポンプによる K^+の細胞内へのくみいれによって細胞内外のイオン濃度を保つ[4][5]ことで細胞膜電位が安定する．神経細胞では約 -70mV，筋細胞においては，約-90mV～-100mV の膜電位をもつ．このように細胞種により異なる[6]ことが知られている．このことを利用して筋芽細胞が筋細胞に分化していく過程での細胞膜電位を計測し，分化判定を行った．

2. 実験方法

〈2･1〉 C2C12 細胞の培養 実験にはマウス骨格筋由来筋芽細胞株 C2C12 細胞を用いた．コラーゲンコートディッシュに増殖用の血清 10%Fetal bovine serum(FBS)含有の培養液 Dulbeco's modified Eagles's medium(DMEM)で C2C12 細胞を培養した．細胞濃度，6.3×10^2cell/cm^2，細胞数 1.4×10^4cell で細胞を播種した．この細胞は，培養液中の血清濃度を下げることで筋細胞へと分化を開始する[5]．そのため細胞がディッシュ底面の約 80%まで増殖した状態で筋芽細胞を筋管細胞へ分化させるため，分化誘導用の血清 7%House serum(HS)含有 DMEM に培養液を変更した．培養液の交換は 2 日毎に行い，培養は 37℃，5%CO_2 湿度 100%の環境下にて行った．培養期間に伴う細胞形態の変化は，位相差顕微鏡を用いて観察した．図 2 より筋芽細胞が融合し，分化の進行につれ筋管を形成していることが確認できた．

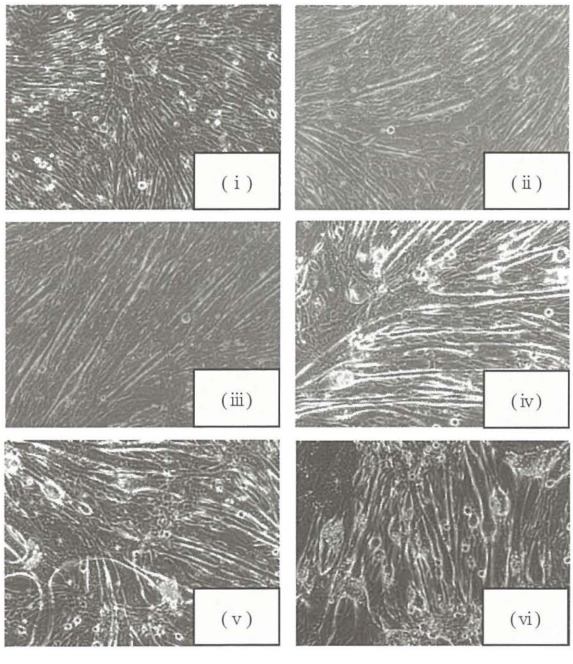


図 2 C2C12 細胞の形態変化(×100) (ⅰ)分化誘導 2 日目 (ⅱ)分化誘導 3 日目 (ⅲ)分化誘導 4 日目 (ⅳ)分化誘導 6 日目 (ⅴ)分化誘導 7 日目 (ⅵ)分化誘導 10 日目

Fig.2 Morphological alteration C2C12 cell (ⅰ) the 2nd day (ⅱ) the 3rd day (ⅲ) the 4th day (ⅳ) the 6th day (ⅴ) the 7th day (ⅵ) the 10th day

〈2･2〉 微小ガラス電極の作製 微小ガラス電極は，細胞内に刺入することにより細胞に及ぼす影響を無視できるほど小さく，細胞膜に損傷を与えないものを作製する必要がある[7]．そこで外径 1mm の中空ガラス管を加熱し，先端の直径が 1μm 以下の針状に加工した．このガラス管内に電解質である 3mol/l KCl 水溶液を満たして Pt 線を浸し微小ガラス電極とした．この電極を図 3 に示す．

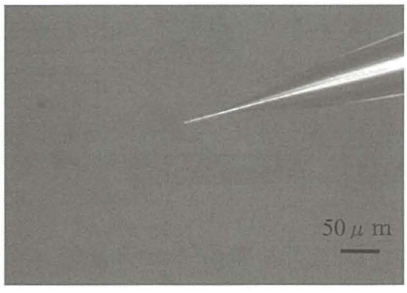


図 3 微小ガラス電極

Fig.3 A micro glass electrode

培養液中に設けた基準電極と，作製した電極の間に 1nA，1kHz の三角波電流を流し，ガラス電極の電位の変化を測定すると図 4 のような方形波が観測された．この波形の振幅より電極抵抗値を求めた．その結果を式(1)に示す．計測には，抵抗値が 10MΩ 程度のものを用いた．

$$R = \frac{9.12[mv]}{10^{-9}[A]} = 9.12[M\Omega] \quad (1)$$

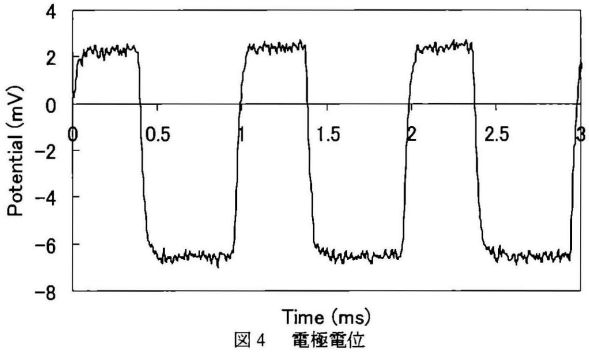


図 4 電極電位

Fig.4 Electrode potential.

〈2･3〉 細胞膜電位計測 細胞膜電位の計測は，倒立顕微鏡下(×400)でマイクロマニピュレータを使用して行った．本実験は，装置周辺の振動や電気ノイズを除去するため接地した防振台の上に倒立顕微鏡とマイクロマニピュレータを配置した．培養液中に Ag 電極を置いて，細胞外培養液を接地した．作製した微小ガラス電極の先端を培養液に浸した時に分極が生じ電位差が発生するが，この電位差はオフセットにより 0mV に補正した．そして微小ガラス電極の先端を細胞内に刺入した時のガラス電極内と Ag 電極との電位差を計測し，細胞膜電位とした．計測は，細胞内電位をガラス電極内の Pt 線から生体計測用の高入力インピーダンス増幅器へ導き，0.3kHz ローパスフィルタを通してオシロスコープ(DC 記録)にて波形を観測した．実験では，細胞に電極を刺入した際にオシロスコープでの波形が安定しないものや顕微鏡下で細胞の形状に変化が見られたものは，細胞膜が損傷したものとみなし，計測結果から除外した．実験装置の接続図を図 5 に示す．

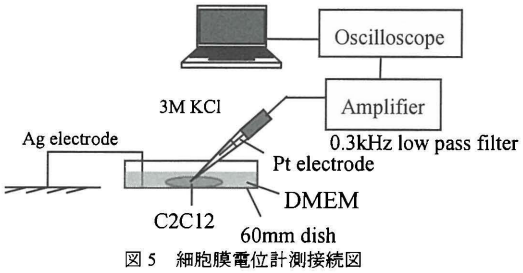


図５　細胞膜電位計測接続図

Fig.5 The experimental setup

〈2･3･1〉　C2C12 細胞の分化誘導と細胞膜電位の変化

ディッシュを７枚準備し，C2C12 細胞を培養した．そして各計測日に１枚のディッシュを使用し，このディッシュ内の異なる 60 個の細胞膜電位を計測した．細胞が増殖し，ディッシュを覆い尽くす直前(サブコンフルエント)になった状態(培養３日目)と分化誘導２日目(培養５日目)，分化誘導３日目(培養６日目)，分化誘導４日目(培養７日目)，分化誘導６日目(培養９日目)，分化誘導７日目(培養 10 日目)，分化誘導 10 日目(培養 13 日目)の細胞膜電位を計測した．

〈2･3･2〉　培養別での細胞膜電位の変化　C2C12 細胞は，細胞同士が核融合し分化をしていく．分化誘導を施すことで分化が促進されるが，増殖培養を続けた場合でも分化していく．そこで C2C12 細胞を増殖培養し続けた場合と分化誘導を行った場合での細胞膜電位の変化を比較した．この実験では，分化誘導を行うディッシュと増殖培養を続けるディッシュをそれぞれ８枚ずつ準備した．分化開始３日前(培養２日目)，分化開始日(培養５日目)，分化誘導１日目(培養６日目)，分化誘導３日目(培養８日目)，分化誘導５日目（培養 10 日目)，分化誘導７日目目(培養 12 日)，分化誘導９日目（培養 14 日目)，分化誘導 11 日目（培養 16 日目)の細胞膜電位を計測した．

3.　実験結果

〈3･1〉　細胞膜電位計測波形　分化誘導７日目の細胞膜電位を計測した波形の例を図６に示す．電極刺入時刻(4s 付近)から抜き出す時刻(16s 付近)までの電位差が細胞膜電位である．この波形の場合，約 12 秒間，約-70mV の安定した細胞膜電位が記録出来ていることが分かる．

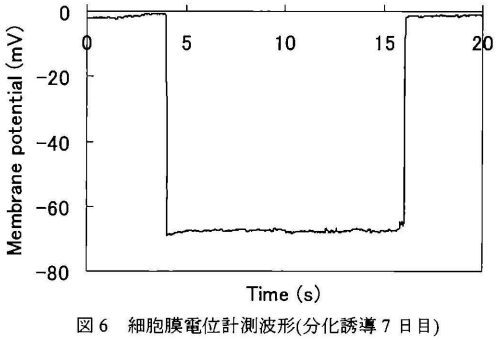


図６　細胞膜電位計測波形(分化誘導７日目)

Fig.6 Wave form of C2C12 membrane potential. (At the 7th day)

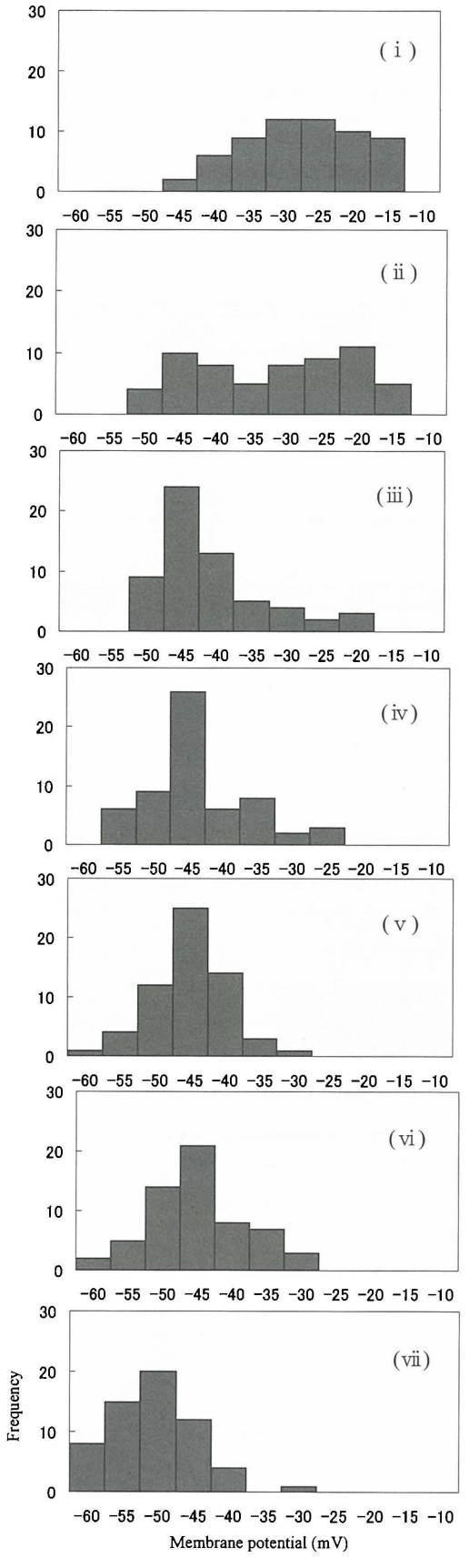


図７　細胞膜電位計測結果ヒストグラム

Fig.7 Histograms of measurement results.

(ｉ) before a differentiation. (ii) the 2nd day (iii) the 3rd day (iv) the 4th day (ｖ)the 6th day (vi) the 7th day (vii) the 10th day

〈3･2･1〉　C2C12 細胞の分化誘導と細胞膜電位の変化

60 個の異なる C2C12 細胞の膜電位を計測し，図 7 のようにヒストグラムにまとめた．分化を開始した分化誘導 0 日目では，-25mV～-30mV に膜電位が多く分布している．分化誘導 2 日目では，-20mV 付近と-40mV 付近に 2 つの分布の山が出来，分化誘導 4 日目からは，-45mV 付近に膜電位が集まり，10 日目では，-50mV～-55mV に多数分布している．

分化に伴って細胞膜電位がどのように変化しているかを詳しく見るために平均値と標準偏差を求めた．この結果を図 8 に示す．サブコンフルエント状態(培養 3 日目)から分化誘導 2 日目(培養 5 日目)，分化誘導 3 日目(培養 6 日目)，分化誘導 4 日目(培養 7 日目)，分化誘導 6 日目(培養 9 日目)，分化誘導 7 日目(培養 10 日目)，分化誘導 10 日目(培養 13 日目)での細胞膜電位は，それぞれ-29.2±8.08mV，-33.8±10.9mV，-43.1±7.56mV，-45.3±7.30mV，-46.7±5.19mV，-47.0±6.68mV，-52.4±6.16mV の値をとっており，分化誘導に伴って細胞膜電位が深くなる傾向にあることが分かる．分化誘導 2 日目から 3 日目で細胞膜電位が約 10mV 深くなっていることが確認できる．

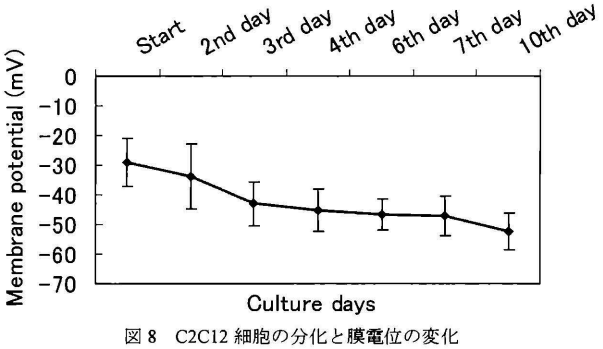


図 8　C2C12 細胞の分化と膜電位の変化

Fig.8 Time course measurement of C2C12 membrane potential.

この計測結果の差を統計学的有意 $p<0.05$, $n=60$ で検定した．その結果，サブコンフルエント状態(培養 3 日目)に対し分化誘導 2 日目(培養 5 日目)と分化誘導 2 日目(培養 5 日目)に対し分化誘導 3 日目(培養 6 日目)に有意差があった．さらに，分化誘導 7 日目(培養 10 日目)に対して分化誘導 10 日目(培養 13 日目)でも有意差が見られた．

〈3･2･2〉　C2C12 細胞の分化誘導と細胞膜電位の変化

DMEM＋7%HS で培養したディッシュを分化誘導群とし，増殖培養である DMEM＋10%FBS を Control 群として，細胞膜電位の違いを調べた．図 9 に計測結果の平均値と標準偏差を示す．

分化開始 3 日前，分化開始日の細胞膜電位計測結果の平均値と標準偏差は，-23.2±5.58mV，-26.2±5.53mV であった．Control 群の 1 日目，3 日目，5 日目，7 日目，9 日目及び 11 日目ではそれぞれ，-32.5±6.82mV，-35.8±6.87mV，-38.4±7.44mV，-40.7±5.71mV，-41.6±6.27mV，-43.7±6.23mV であった．次に分化誘導群の分化誘導 1 日目，分化誘導 3 日目，分化誘導 5 日目，分化誘導 7 日目，分化誘導 9 日目，分化誘導 11 日目は，-37.2±7.01mV，-44.1±6.92mV，-47.6±6.01mV，-47.1±5.23mV，-48.1±5.23mV，-49.0±7.56mV であった．

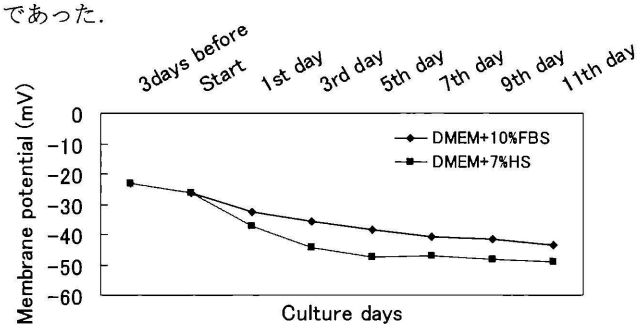


図 9　培養別での細胞膜電位の変化

Fig.9 Time course measurement of C2C12 membrane potential.

分化誘導群と Control 群で計測結果の差を〈3･2･1〉と同様に検定を行った．この結果，すべてにおいて有意な差が見られた．このことより，分化誘導を施した方が細胞の分化が進行していることが分かる．

〈3･3〉　自己拍動時の細胞膜電位　C2C12 細胞の分化の過程で自己拍動を起こす筋管細胞が顕微鏡下で確認できた．この拍動時の細胞膜電位の変化を計測して得られた波形を図 10 に示す．図 10 より電極刺入点から電位は，マイナス方向に発生するが，約 10 秒間スパイク状の信号を発している．この信号は，周波数 1.56Hz であることが確認された．

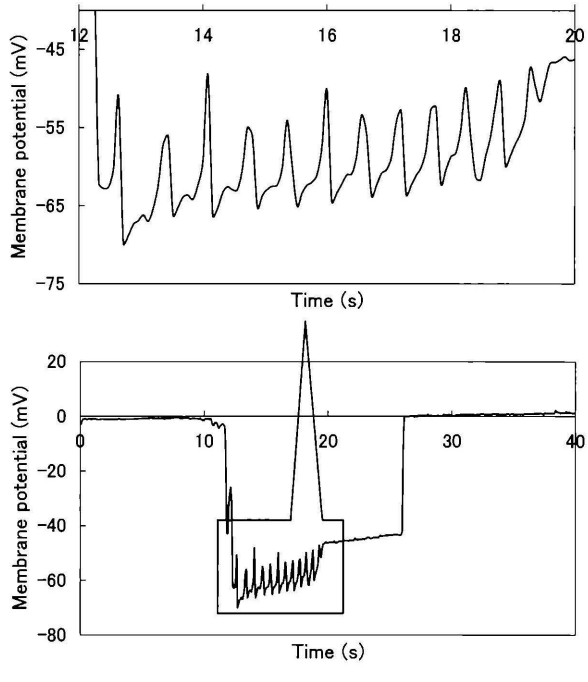


図 10　自己拍動時の細胞膜電位波形

Fig.10 C2C12 membrane potential during self contraction.

4. 考察

C2C12 細胞の分化誘導では，増殖用培養液から含有成分が異なる分化誘導用培養液に交換する．このため，細胞膜電位計測に何らかの影響を及ぼすことが危惧される．そこで培養液中の成分の違いが，細胞膜電位計測に影響を与えるか調べるため，2 枚の単核の筋芽細胞のディッシュを準備した．そして，一方のみを分化誘導用培養液に置換して細胞膜電位を計測した．その結果，培養液の違いが細胞膜電位に影響を与えないことを確認することが出来た．

本実験において，C2C12 細胞の分化に伴い細胞膜電位が深くなる傾向にあり，分化誘導 4 日目(培養 7 日目)から分化誘導 10 日目(培養 13 日目)の間で，-45mV～-55mV 付近に細胞膜電位が多く分布していくことが図 4 より分かった．

また岩瀬らは，筋細胞の膜電位は，約-90mV～-100mV である[6]と報告している．また電気刺激下で培養し，筋管を形成したラット筋芽細胞株 L6 細胞の膜電位は，-59.4±9.2mV である[8]とも報告されている．本実験で得た値とは異なるが，これは，C2C12 細胞が株化された細胞であることと，培養条件下では生体内の状態と異なり，完全な筋細胞への成熟は起こらない[2]ことが原因として考えられる．筋芽細胞単体を培養し，細胞融合を経て筋細胞へと成長させるには，最適な培養条件を見出す必要がある[9]．今回の C2C12 細胞の培養では，多核筋管細胞に分化したことは確認できたが，筋細胞特有の横紋状の線維が見られなかったことから，筋管細胞から筋細胞には成熟していなかったと考えられる．

図 2 に示したように，分化誘導 3 日目から 4 日目にかけて，C2C12 細胞の形態に大きな変化は見られないが，図 8 に示すように細胞膜電位は深くなっている．このことは顕微鏡下で細胞の形態に変化が見られなくても，細胞膜電位を計測することにより，細胞の分化の段階を定量的に調べることができる可能性を示唆するものである．そして C2C12 細胞を分化誘導した場合と増殖培養を続けた場合での細胞膜電位の変化を調べた．顕微鏡下での細胞の形態は，分化誘導を行った場合が，増殖培養を続けた場合よりも早く多核の筋管を形成していた．培養 9 日目以降は，増殖培養を続けた細胞でも太い多核の筋管細胞を形成していた．細胞膜電位は，どちらの場合でも深くなっているが，分化誘導を行って培養した細胞が，計測結果は，さらに深くなっていた．増殖培養を続けた C2C12 細胞は，自己拍動を確認出来なかった．

さらに自己拍動する細胞の膜電位の変化を計測することが出来たことから，外部から電気信号を入力した際の細胞の動きを定量的に評価することも可能であると考えられる．自己拍動は，筋管を形成した L6 細胞で振幅 21mV，周波数 1.6Hz の活動電位が発生するという報告がなされている[8]．今後は，分化の指標となる蛋白質や代謝の指標となる培養液中のグルコース消費量を調べ，細胞膜電位の変化と関連付けてより詳しく調べる必要がある．これらによって筋芽細胞の分化や活性を判定できる新しい技術が開発出来ると考えられる．

5. まとめ

C2C12 細胞を培養し，分化誘導することにより，これに伴う細胞膜電位の変化を調べた．今回の計測結果より分化が進む過程で細胞膜電位が深くなる傾向にあることが分かった．そして分化誘導後，自己拍動を起こした細胞では，膜電位計測時に周波数 1.56Hz の信号を発した．

本研究は，私立大学学術研究高度化推進事業，学術フロンティア推進事業「培養筋の医工学応用」および科学研究費補助金，若手研究(B)「液晶の電気光学効果を直接利用した細胞膜電位測定技術の開発」の支援を受けている．

文　献

(1) 大西優貴，川北悠介，山﨑健一，藤里俊哉，宇戸禎仁: 「筋芽細胞の膜電位計測に関する研究」，平成 18 年電気関係学会関西支部連合大会予稿集 (2006)
(2) 三井洋司：「機能細胞の分離と培養」，pp.349-355，丸善 (1987)
(3) 大野忠雄，黒澤美枝子，高橋研一，細谷安彦：「トートラ人体の構造と機能，p.302，丸善 (2007)
(4) 曽我部正博：「イオンチャンネル電気信号の作る分子」，pp.2-14，共立出版 (1997)
(5) Fred Delcomyn 著，小倉明彦，富永恵子訳：「ニューロンの生理学」，pp.85-87，トッパン (1999)
(6) 岩瀬善彦，玉重三男，古河太郎，小立正彦：「生物電気」，p.8，南江堂 (1970)
(7) 吉田徹：「医用計測技術」，p.98，コロナ社 (1979)
(8) Kawahara Y, Yamaoka K, Iwata M, Fujimura M, Kajiume T, Magaki T, Takeda, M Ide T, Kataoka K, Asashima M, Louis Yuge : Novel Electrical Stimulation Sets the Cultured Myoblast Contractile Function to 'On', Pathobiology73, pp.288-294 (2006)
(9) 筒井博司，采女哲士，出谷耕，吉浦昌彦：骨格筋培養のためのスキャフォールド設計，生体医工学シンポジウム 2007 講演予稿集 (CD-ROM)，日本生体医工学会，北海道，2007

（平成20年10月20日受理）

大　西　優　貴

1983年3月1日生。2006年3月大阪工業大学工学部電気電子システム工学科卒業. 2008年3月　同大学大学院工学研究科電気電子工学専攻博士前期課程修了. 現在　㈱ＨＯＹＡに勤務.

川　北　悠　介

1984年5月13日生. 2007年3月大阪工業大学工学部電気電子システム工学科卒業. 現在, 同大学大学院工学研究科電気電子工学専攻博士前期課程在学中.

山　﨑　健　一

1982年1月21日生. 2006年3月大阪工業大学大学院工学研究科電気電子工学専攻博士前期課程修了. 現在, 同大学大学院工学研究科生体医工学専攻博士後期課程在学中.

藤　里　俊　哉

1986年京都大学工学部高分子化学科卒業. 1991年京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻博士後期課程認定退学. 京都大学生体医療工学研究センター（現再生医科学研究所）研修員, マギル大学付属モントリオール総合病院研究所研究員, 国立循環器病センター研究所再生医療部機能再生研究室長などを経て, 2007年より大阪工業大学工学部生体医工学科教授, 現在に至る. 工学博士. 専門は, バイオマテリアル、再生医工学. バイオマテリアル学会, 再生医療学会, 日本生体医工学会, 人工臓器学会、高分子学会, 組織工学会の会員.

宇　戸　禎　仁

1992年愛媛大学工学部電気工学科卒業. 1997年大阪大学大学院工学研究科電子工学専攻博士後期課程修了. 同年大阪工業大学工学部電気工学科講師. 2008年より大阪工業大学工学部生体医工学科准教授, 現在に至る. 博士（工学）. 専門は, 液晶の電気・光物性, 電気生理. 日本物理学会, 電気学会, 日本液晶学会, 応用物理学会, 日本神経科学会, 日本生体医工学会の会員.