

原子間力顕微鏡による初代培養筋細胞の観察と硬さ測定の試み

岩崎 智 仁¹⁾・鷺尾 昌 敬¹⁾・山本 克 博¹⁾・中村 邦 男²⁾

Morphological observation and rheological measurement of rat myoblast during differentiation using atomic force microscopy.

Tomohito IWASAKI¹⁾, Masahiro WASHIO¹⁾, Katsuhiko YAMAMOTO¹⁾ and Kunio NAKAMURA²⁾
(Accepted 13 January 2009)

緒 論

我々が一般に食肉としているのは家畜の骨格筋である。骨格筋は多数の筋細胞の束から形成されており、個々の筋細胞は細長い円筒形の多核細胞で、筋線維とも呼ばれている。筋線維は多数の筋原線維の束から形成され、筋原線維は筋肉の収縮機能の基本単位となっている。

筋組織中の基底膜と筋形質膜の間には筋衛星細胞が休眠状態で存在しているが、筋組織が何らかの原因により損傷した時に損傷部位から放出される肝細胞増殖因子 (HGF) の作用で筋衛星細胞は活性化して筋芽細胞となり損傷部分を修復する。現在までに、筋組織修復時の筋芽細胞の遊走¹⁾や筋特異的タンパク質の発現時期に関する研究²⁾ならびに筋衛星細胞の活性化機構に関わる研究^{3,4)}が精力的に進められている。

細胞運動と細胞骨格の関係や細胞機能の発現については、ケモカインやサイトカイン、増殖因子などの細胞外からの化学的な刺激によって誘起される細胞内の生化学的変化を指標として、これまでに徹底的な研究が行われてきた。しかし、化学的なシグナルだけではなく物理的な要因が実は細胞の生育に多大な影響を及ぼしていることが近年明らかになりつつある。これらの報告の中で、Ingber は、増殖因子そのものが細胞の生死に対して決定的な因子ではなく、細胞がおかれた微小環境、すなわち細胞の接着基盤の硬さや接着面積等に起因する細胞骨格構造とそれに関わる物理的な力という総合的な力学制御機

構が、増殖因子の刺激を受けた細胞の生死を決定するのに重要であると提唱している^{5,6)}。さらには、その総合的な力学制御機構が増殖因子の活性化をも制御しているとの報告もある⁷⁾。これら一連の研究は、線維芽細胞や上皮細胞、平滑筋細胞を使用して行われ、同様の接着性細胞である骨格筋細胞に関しては、いくつかの報告が存在するのみである^{8,9)}。筋細胞の増殖分化のメカニズムを理解するためには、この総合的な力学制御機構を明らかにする必要がある、筋細胞自体の硬さを測定することが重要である。

走査型プローブ顕微鏡 (SPM) の一種である原子間力顕微鏡 (AFM) は、試料と探針の間に働く原子間力を検出する装置であるため、試料に制限がなく、金属、半導体、医療、製薬などの産業分野や、物理学、化学、生物学などの分野で応用されている。特に液中環境でも試料を観察できることから生体試料の表面構造を生きたままの状態を観察可能であり、近年生命科学分野での利用が盛んになっている。また、AFM では探針を試料に直接接触させることで形状観察を行うので、試料の力学的な情報も得ることができる。したがって、AFM を使用することで今までは測定できなかったタンパク質一分子の弾性率や、細胞の局所的な弾性率の測定が可能になった。現在までに線維芽細胞^{10,11)}や骨細胞¹²⁾などの細胞やタンパク質^{13,14)}などの形態観察ならびに弾性率測定が行われ、新規な知見が得られているが、骨格筋細胞の生きたままでの AFM 観察に関する報告はない。そこで本実験では筋衛星細胞 (初代培養筋細胞) が分化していく過程の細胞形態を AFM にて観察

¹⁾ 酪農学園大学酪農学部食品科学科
Department of Food Science, Faculty of Dairy Science, Rakuno Gakuen University

²⁾ 酪農学園大学大学院酪農学研究科
Graduate School of Dairy Science, Rakuno Gakuen University
北海道江別市文京台緑町 582
582, Bunkyo-daimidori-machi, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

し、さらに細胞の硬さを計測することで筋細胞の分化と細胞の硬さの関係を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

1. 初代培養筋細胞の単離

筋衛星細胞は Allen らの方法¹⁵⁾を一部改変して、ラット背部および後肢部の骨格筋から以下の方法にて単離した。ラットにデシケータ中でジエチルエーテルを吸引させて安楽死させ、70%エタノールでラットの体毛を殺菌してクリーンベンチ内に移した。採取した骨格筋から結合組織と脂肪組織を可能な限り取り除いた後、はさみを用いて細切した。4 unit/mlのプロテアーゼ type XVII (Sigma)を含む30 mlのPBSに対して、ミンチした筋肉を10 gとなるようにコンカルチューブに分注した。15分毎に攪拌し、37°Cで1時間プロテアーゼ処理した。処理後1,500×gで4分間の遠心分離を行い、得られた沈殿部に37°CのPBSを35 ml加え、ホルテックスミキサーを用いて20秒間攪拌した。懸濁液を500×gで10分間遠心分離を行い、得られた上清部を回収した。沈殿部に再び35 mlのPBSを加え20秒間攪拌し、500×gで8分間遠心分離をした。同様に上清部を回収し、沈殿部に35 mlのPBSを加え20秒間攪拌後、500×gで5分間の遠心分離により上清部を得た。回収した全ての上清部を1,500×gで4分間遠心分離し、得られた沈殿部に10%の馬血清(以下HS, Gibco製)、0.5%ゲンタマイシン、1%抗生物質-抗真菌剤混合液(ペニシリン、ストレプトマイシン、アンフォテリシンB, Gibco)を含むダルベッコ改変イーグル培地(以下DMEM, Sigma)を少量加えて沈殿部を懸濁し、1本のコンカルチューブへ集め、懸濁液に培地を加えて40 mlとした。セルストレイナーで懸濁液をろ過した後、1,500×gで4分間遠心分離し、得られた沈殿部に少量の培地を加えて再懸濁し40 mlとした。この操作を再度繰り返し、細胞以外の屑を取り除いた。2回目の遠心分離で得られた沈殿部に少量の培地を加えて20 mlとし、懸濁した。よく攪拌した懸濁液を100 mmのシャーレに10 mlずつ播き、CO₂濃度を5%に保ったCO₂インキュベーターで37°C、3時間の前培養を行った。前培養後の懸濁液を回収し、別のシャーレでさらに2時間の前培養を行った。2回の前培養が終わった懸濁液を回収し、血球計算版を用いて細胞密度を測定した。70 cells/mm²となるように細胞濃度を調整し、10 mm角のガラス板の入った35 mmのシャーレに懸濁液を各3 mlずつ播いた。このシャーレを

37°C、5%CO₂の条件下で細胞培養した。培地には1%抗生物質-抗真菌剤混合液を含む10%HS-DMEMを使用し、培地交換は毎日行った。

単離した細胞は培養2日目に、筋細胞に特異的に発現するタンパク質であるデスミンを検出するためにデスミン染色を行い、95%以上がデスミン陽性細胞、すなわち筋細胞であることを確認した上で実験に供した。

2. デスミン染色

デスミン染色は Allen らの方法¹⁵⁾を用いて以下のとおりに行った。37°Cに加温したPBSで細胞を洗浄し、培地に含まれる血清成分を十分に除いた。4%パラホルムアルデヒドを含むPBSで20分間、細胞を固定し、0.5%Triton X, PBSで10分間の洗浄を3回行った。その後、4%正常ヤギ血清, PBSで20分間のブロッキング処理を行い、1 μg/mlのanti-desmin rabbit IgG polyclonal antibody (Neo Markers, RB-9014-P1)を含む0.5%BSA, PBSで2時間、室温で反応させた。2時間経過後、PBSで5分間の洗浄を3回行った。次に5 μg/mlのanti-rabbit IgG goat IgG peroxidase conjugate (Sigma, A 6667)を含む0.5%BSA, PBSで2時間、室温で反応させた。二次抗体で2時間反応後、PBSで5分間の洗浄を3回行った。その後、遮光下で、0.05 mg/mlのDAB, 0.4%の過酸化水素を含むPBSで5分間反応させた。5分経過後、PBSで5分間の洗浄を3回行った細胞を顕微鏡で観察した。ガラス片一枚につき10視野を撮影した。デスミン染色像を明視野で観察し、位相差像と比較して、次式を用いて筋芽細胞の割合を求めた。

$$\text{筋芽細胞 (\%)} = (\text{デスミン陽性細胞数} / \text{全細胞数}) \times 100 \quad (1)$$

3. AFMによる観察

原子間力顕微鏡はSPA300HV (Seiko Instruments Inc.)を使用した。培養1日目から5日目までの細胞を用い、37°Cに加温した10%HSを含むRinger溶液(140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, 1 mM Na₂HPO₄, 25 mM グルコース, 25 mM HEPES, pH 7.4)中でAFMによる観察を行った。

細胞を生きたまま観察するためにはRinger溶液を37°Cに維持する必要があるために、ガラスの片面にインジウムが被膜されているITOガラスを用いて観察中に溶液を37°Cに維持できるシャーレを自作した。ITOガラスは被膜面が抵抗を持つために

電流を流す事で発熱する。この発熱を測定中の溶液温度の保持に利用した。被膜面がシャーレの裏側となるようにし、被膜されていない面に内径 33 mm、高さ 5 mm のプラスチックのリングをエポキシ樹脂を用いて接着した。このシャーレに 320 mA の電流を流すと溶液の温度が 37°C に維持されることが分かったので、測定中に 320 mA の定電流を流すことで溶液温度を一定に保持した。AFM 測定時には細胞の張り付いているガラス板の四辺をデンタルワックスを用いて自作シャーレ上に固定した。測定モードはタッピングモードを使用した。測定には最大走査範囲が 100 μm 、高さ方向に 15 μm 移動可能なスキャナーを使用し、バネ定数が 0.6 N/m、探針の高さが 15 μm 、探針を円錐とみなした時の開き角度が 30° のカンチレバー-NSC 36 (μmasch) を使用した。測定パラメーターは、I ゲインを 0.028, P ゲインを 0.0024, A ゲインを 2, S ゲインを 5, 走査周波数を 0.05 Hz, 回転角度を 90° に設定して行った。画像は高さの情報が得られる形状像と、表面の微細な凹凸が得られる誤差信号像を測定した。

4. フォースカーブ測定

細胞の形状を測定した後、カンチレバーを細胞に押し込むことでフォースカーブを得た。フォースカーブとは、カンチレバーを試料から離れた位置から徐々に試料へ押し付けた時のカンチレバーにかかる試料からの応力とカンチレバーの移動距離の関係を示した曲線である。このカーブの傾きが急である程、試料の弾性率が高いことを示している。フォースカーブ測定条件は、カンチレバーの引き離し距離を単核細胞の場合は 4 μm 、筋管では 5 μm とし、レバーの押し込み量を 300 nm、往復に要する時間を 1 秒とした。一枚の測定画面中で測定できるフォースカーブ 10 本中の 2 本はガラスを試料として測定を行い、正しく測定ができていることを確認した。得られたフォースカーブにカーブフィッティングを行い、フォースカーブの傾きを求めた。カーブフィッティングは開始地点からカンチレバーが 300 nm 進んだ地点までで行い、Hertz の理論に基づいて、式(2)を用いて弾性率を求めた¹⁶⁾。

$$Z - Z_0 = \frac{F}{k} + \sqrt{\frac{2}{\pi} \frac{E}{1 - \nu^2} \tan \theta} \quad (2)$$

この時、 Z はレバーの変位 (m)、 Z_0 はレバーが接触した位置 (m)。 F は荷重 (N)、 k はバネ定数 (N/m)、 $\tan \theta$ は開き角、 ν はポアソン比 (0.5)、 E は弾性率 ($\text{Pa} = \text{N/m}^2$) を示している。なお、Figure 1

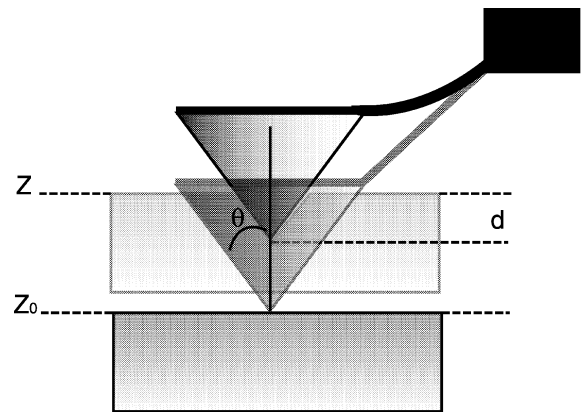


Figure 1 Schematic drawing of the movement of AFM cantilever. θ is the half-opening angle of the tip. Z_0 is the Z position at the point of contact, Z is the piezoelectric extension, d is the indentation of the sample surface.

に計算パラメータの模式図を示した。

5. アクチンフィラメント、デスミンならびに核の観察

細胞を 37°C に加温した PBS で 3 回洗浄し、培地に含まれる血清成分を除去した。その後、1%ホルムアルデヒドを含む PBS で 90 分、室温で細胞を固定した。細胞を固定後、1% Triton X を含む PBS で 10 分間の処理を 3 回行った。その後、PBS で 10 分間の洗浄を 3 回繰り返した。アクチンフィラメントに特異的に結合するローダミン標識したファロイジン (Molecular Probes, R-415) を 2 unit の濃度で 90 分間、遮光状態で反応させた。遮光状態を保ったまま、PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行った。次に 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の DAPI (Molecular Probes, D-1306) を遮光状態で 10 分間反応させた。PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行い観察試料とした。デスミン染色は、細胞を固定後に PBS で 10 分間の洗浄を 2 回行い、その後、4%標準ヤギ血清、0.1% Triton X を含む PBS で 20 分間のブロッキング処理を行って、1 $\mu\text{g/ml}$ の anti-desmin rabbit IgG polyclonal antibody (Neo Markers, RB-9014-P1) で 1 時間、室温で反応させた。PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行い、4 $\mu\text{g/ml}$ の anti-rabbit IgG goat IgG FITC conjugate (Cedarlane, CL6100F) で 90 分間遮光状態で反応させた。その後の DAPI 染色はアクチンフィラメントの場合と同様に行った。いずれの試料も、2 重染色終了後に蛍光顕微鏡にて観察した。

6. 透過型電子顕微鏡 (TEM) による細胞骨格構造の観察

Permanox dish に培養した細胞を 37°C に加温した PBS で 3 回洗浄し, 2.5% グルタルアルデヒドを含む PBS で 1 分間固定した。固定後, PBS で 10 分間の洗浄を 3 回行い, 次いで 2% タンニン酸溶液で 20 分間処理した。その後, 再び PBS で 10 分間の洗浄を 3 回行い, 1% オスミウム酸で 20 分間処理した。蒸留水で 10 分間の洗浄を 3 回行い, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 100% EtOH の順で各 20 分間の脱水処理を行った。次に EtOH : 包埋剤 = 2 : 1 の溶液で振盪しながら 30 分処理し, 次に EtOH : 包埋剤 = 1 : 1 の溶液で同じく振盪しながら 30 分処理した。続いて EtOH : 包埋剤 = 1 : 2 の溶液で振盪しながら 1 時間処理した。1 時間後, 溶液を取り除き包埋剤で 2 時間処理した。包埋剤を交換し 30 分間置き, もう一度包埋剤を交換して液量の高さが 3~5 mm になるように包埋剤を入れ 5 分間静置後, 60°C のインキュベータで一晩, 加温重合させた。樹脂が硬化したのを確認し, シャーレから樹脂を外した。樹脂から目的の細胞を含む様に直径約 5 mm 程度の円形に切り出し, 超薄切片を作成した。これを電子染色し, TEM で観察した。包埋剤は methyl nadic anhydride : Quetol 812 : dedecenyl succinic anhydride = 5 : 10 : 5 の重量比で混合し, 使用前に混合液 6.67 g に対して DMP を 0.1 g 加えてよく攪拌したものを使用した。

結 果

1. AFM の観察条件の検討

筋細胞の形状を AFM で観察するために必要な時間が, グルタルアルデヒド固定した細胞で 1 時間以上かかることが予備実験で明らかになったので, まず細胞が CO₂ インキュベータ外で長時間生存していただける培地条件を検討した。通常の培養に用いる 10% HS を含む DMEM 培地, Ringer 溶液, 10% HS を含む Ringer 溶液を準備し, 自作したシャーレに各溶液と細胞が接着しているガラス片を共に入れて, 温度を 37°C に維持した。10% HS を含む DMEM 培地では 20 分経過した時点で細胞が丸くなり始め, 1 時間後では殆どの細胞が球状になった (Figure 2a)。Ringer 溶液では 40 分経過した頃から細胞が球状に変形し始め, 1 時間が経過した時点では半数近くの細胞が球状に変形していた (Figure 2b)。10% HS を含む Ringer 溶液の場合では, 2 時間経過しても細胞が球状に変形することはなく, 細胞が動き回っている様子が観察され, 細胞が正常に活動して

いることが確認できた (Figure 2c)。以上の結果から, 生きた細胞の AFM 測定には 10% HS を含む Ringer 溶液を使用することにした。

AFM は, カンチレバー先端が試料表面に直接接触れることによって画像を得るという観察方法であるために, カンチレバーの先端形状と試料 (細胞) の形状の関係が重要である。筋細胞は線維芽細胞や上皮細胞と異なり, 紡錘形で高さのある形状をしており, 分化融合していくとさらに高くなることをあらかじめ光学顕微鏡観察で確認した (データ未掲載)。一方, カンチレバーは, 先端半径が 5-40 nm, 先端の長さが 3-20 nm, 先端の開き角は 30-90°, レバーのバネ定数は 0.02-400 N/m と様々な種類がある。我々はいくつかのレバーを検討した結果, 先端径が 10 nm, 長さが 15-20 nm, 開き角が 30°, バネ定数 0.6 N/m のレバーが筋細胞の観察には適していると判断した。

2. AFM による形態観察と物性解析

前項において確立した条件下で, 培養 1 日目から培養 5 日目までの生きた筋細胞を AFM にて観察し, それらの形状を Figure 3 に示した。単核の筋芽細胞の高さは約 3 μm , 筋管を形成している細胞は 5~15 μm 程度であった。培養 4 日以降になると, より多くの細胞が融合して大きな筋管となり, 100 μm 四方内を走査しても全長を計測することはできなかった。線維芽細胞を AFM で観察した場合^{17,18)}には, カンチレバーが非常に小さな力で細胞に接触しているために, その内部構造を反映して細胞骨格であるストレスファイバーの存在が確認されているが, 本研究での筋細胞ではストレスファイバーは観察されなかった。

細胞の硬さは一様ではなく内部構造によって硬さが変わることが細胞の弾性分布測定によって明らかになっている^{17,18)}。特に, 核が存在する部位は, その他の部位に比べて柔らかいことが知られており, 本研究では筋細胞の核以外の任意の部位でのフォースカーブ測定を行った (Figure 4)。得られたフォースカーブから式(2)を用いてカーブフィッティングを行い弾性率を求めた (Figure 5)。弾性率は培養 1 日目で 1.27 ± 0.36 kPa, 培養 2 日目で 1.77 ± 0.58 kPa, 培養 3 日目で 2.32 ± 0.93 kPa となり, 培養日数が増すにつれて細胞の弾性率が高くなる傾向がみられ, 培養 5 日目では 5.92 ± 2.27 kPa を示した。特に, 培養 4 日目からの弾性率は有意に高くなった。

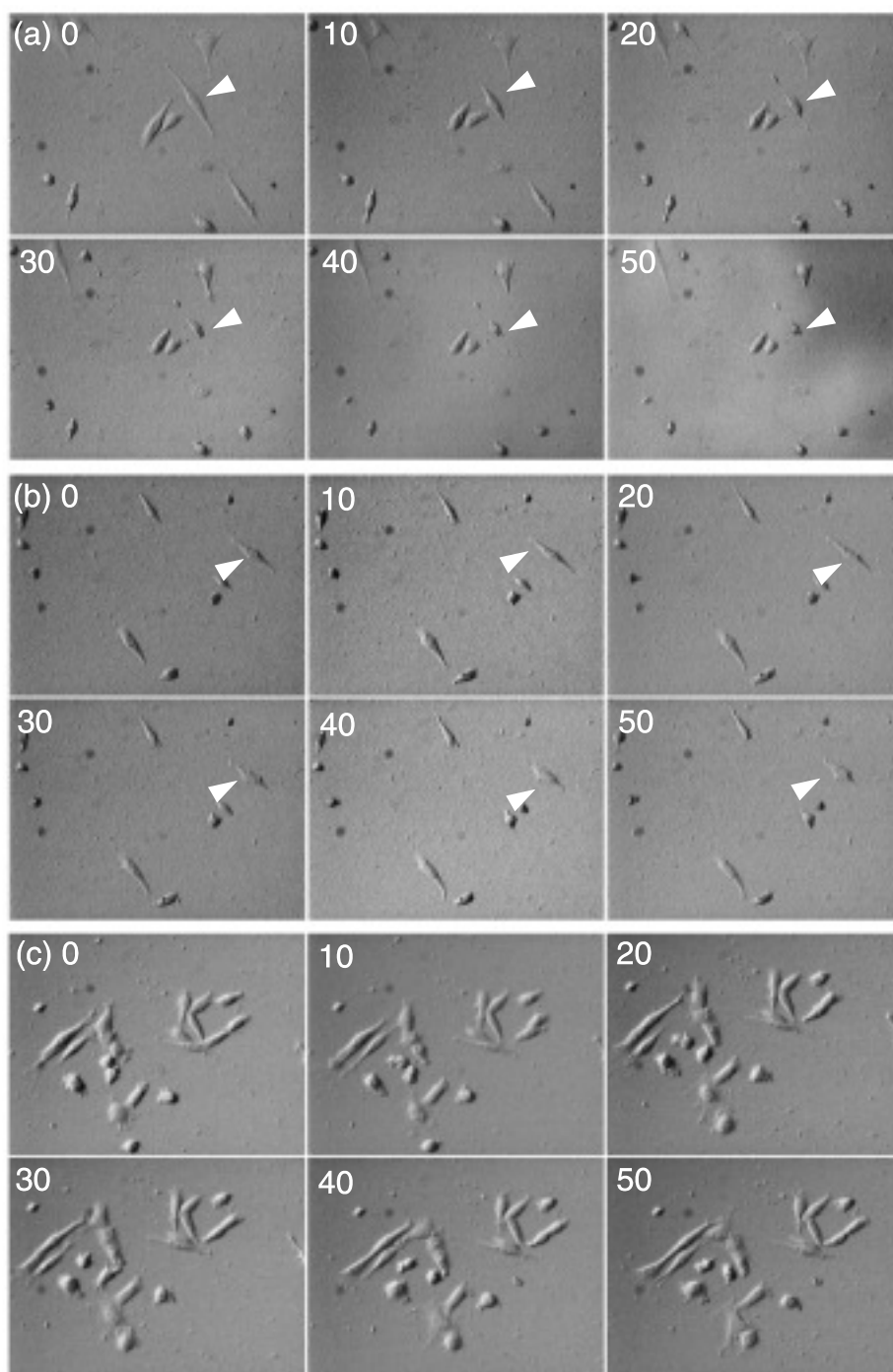


Figure 2 Time-lapse images of myocyte in the different mediums. (a); DMEM + 10% HS, (b); Ringer solution, (c); Ringer solution + 10% HS. Arrowhead indicates deformed cell during observation. The number in each photograph indicates minutes.

3. 細胞骨格構造の観察

細胞の硬さには細胞骨格が大きく関係している^{10,19,20}。そこで、細胞内部の細胞骨格構造を観察するために、アクチンフィラメントから構成されるストレスファイバーと、中間径フィラメントの一つであるデスミンフィラメントを間接蛍光抗体法により

観察した。培養1日目から5日目までの細胞内アクチンフィラメントの蛍光像を Figure 6a-e に示した。培養日数に関わらず、細胞の中央付近では細胞の長軸方向と平行にアクチンフィラメントが存在し、核の部分ではアクチンフィラメントの密度が低くなっている様子が観察された。さらに、培養日数

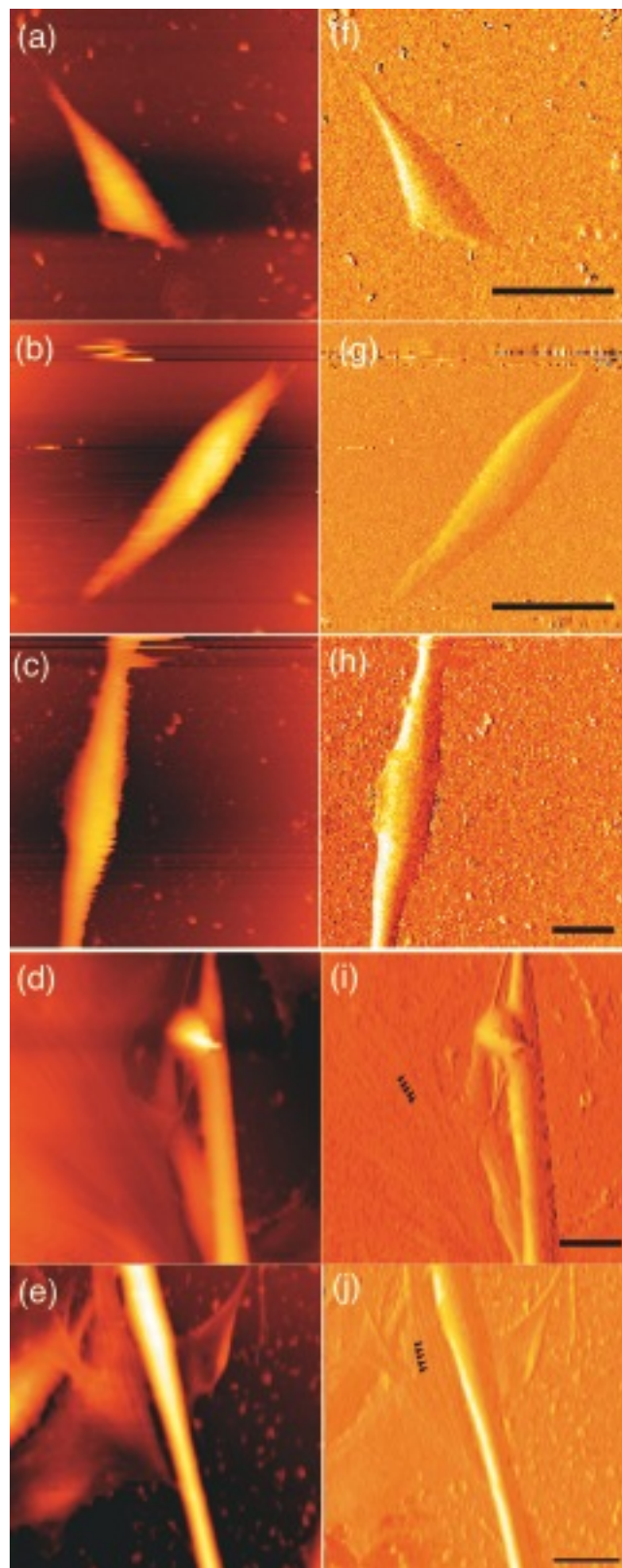


Figure 3 Topographic (a-e) and error signal images (f-j) of myocyte in Ringer solution containing 10% HS at 37 °C. (a) and (f); cultured at 1 day in DMEM containing 10% HS, (b) and (g); 2 days, (c) and (g); 3 days, (d) and (i); 4 days, (e) and (j); 5 days. Arrowheads indicate stress fiber in fibroblast. Scale bar indicates 20 μm .

が経過するに従いアクチンフィラメントの密度が高くなって行く様子が観察された。デスミンフィラメントの蛍光像は Figure 6f-j に示した。デスミンの分布もアクチンと同様に細胞全体に広く存在している様子が観察され、培養日数に伴い密度が高くなった。

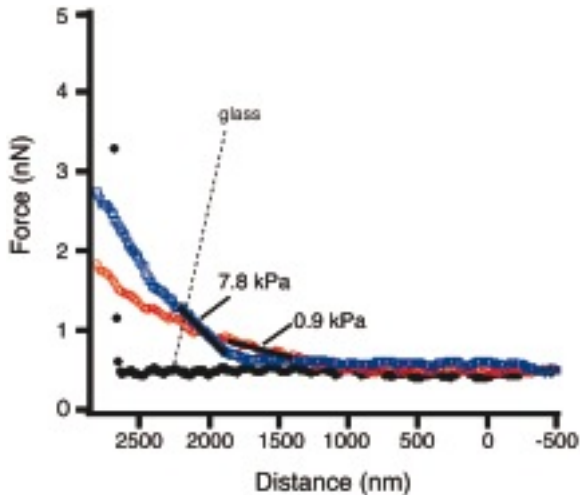


Figure 4 Force curve of a myocyte. The solid lines indicate the region used for calculation of elasticity. The calculated elasticities were 7.8 (cultured cell at 5 days, blue) and 0.9 kPa (2 days, red).

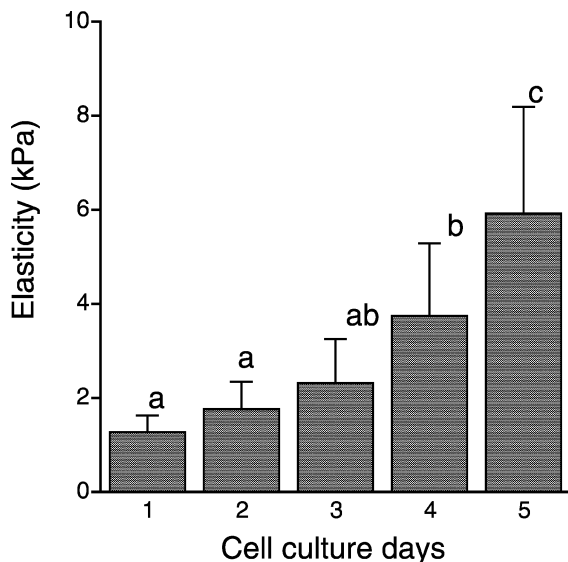


Figure 5 Elasticities of myocyte. Results represented the means \pm SD of 15-30 separate experiments. The value not sharing a letter differ; $P < 0.05$. SD = standard deviation. Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) and Tukey HSD test using Kaleida Graph ver. 3.6 for Macintosh.

筋細胞の詳細な内部構造を観察するために超薄切片を作成し透過型電子顕微鏡 (TEM) での観察を行った (Figure 7)。培養日数が増加するにつれ、細胞の内部にフィラメント様の構造物が形成されていく様子が観察された。培養3日目以降では筋芽細胞同士が融合し多核の筋管を形成し、細胞中には幼若な筋原線維が観察された (Figure 7b, c, d)。

考 察

本研究により、筋細胞の生きたままの形態を AFM にて観察することが可能となり、筋細胞は分化に伴い硬くなることが判明した。骨格筋細胞はその形状のためか、これまでに AFM による観察結果は報告されておらず、その弾性率の変化だけが

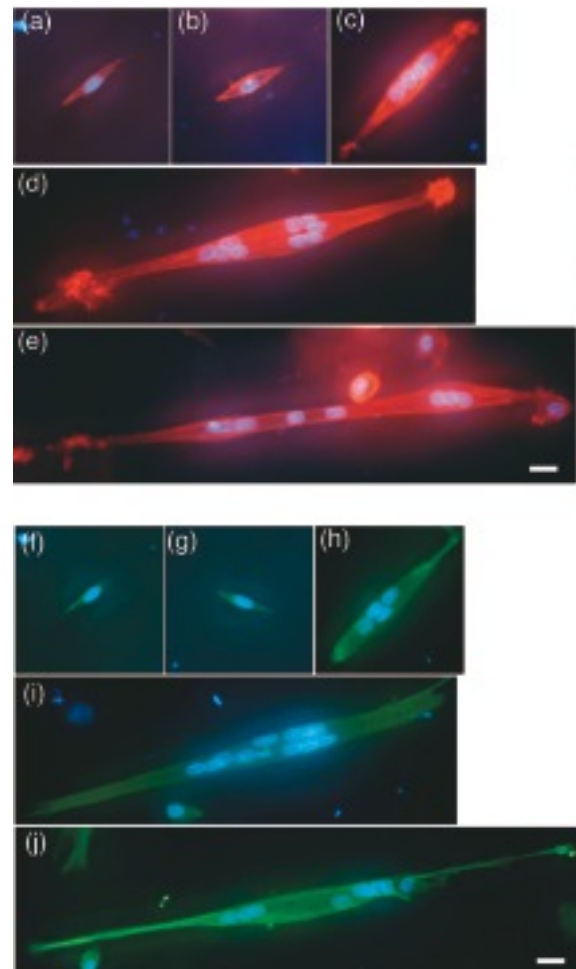


Figure 6 Immunofluorescence images of actin filament/nucleus (a-e) and desmin/nucleus (f-j) in cultured myocyte. red; actin filament, green; desmin, blue; nucleus. (a) and (f); cultured at 1 day, (b) and (g); 2 days, (c) and (h); 3 days, (d) and (i); 4 days, (e) and (j); 5 days. Scale bar indicates 20 μ m.

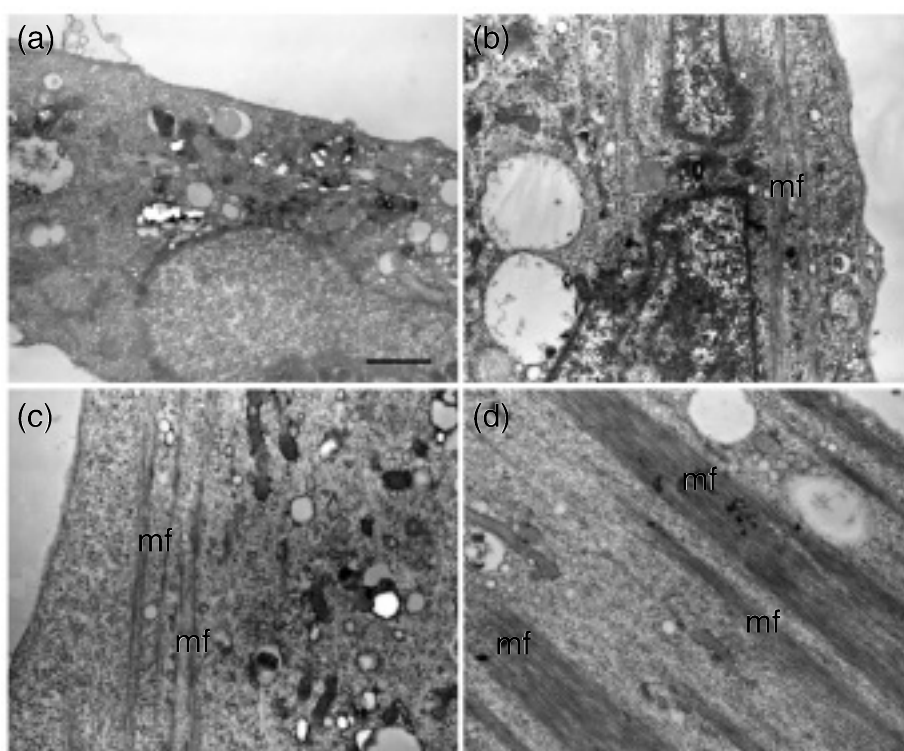


Figure 7 Electron micrographs of myocyte. (a); cultured at 2 days, (b); 3 days, (c); 4 days, (d); 5 days. Mf indicates immature myofibril, and the scale bar in (a) indicates 1 μm .

Truskey らによって報告されている⁹⁾。彼らは、光学顕微鏡下で目的の細胞を捕えて、細胞にカンチレバーを押し込む方法で株化した筋細胞 (C_2C_{12}) の弾性率を測定している。この手法では形態的にいずれの部位の弾性率を測定したのか明確ではない。また、株化した筋細胞は、接着タンパク質であるコラーゲンやフィブロネクチンをコートしていないプラスチックやガラスデッシュでも適切な培養条件であれば分化に至る。しかしながら、株化していない初代培養筋細胞は、上記した接着タンパク質をコートした培養基版に播種しても基盤への接着力が弱く、培地交換時や AFM 観察時に細胞（特に筋管細胞）が剥離してしまうという現象がしばしば観察された。このような現象は、2種類の細胞において接着基盤との接着力に明らかな違いがあることを示唆している。接着力の違いは細胞と基盤の接着点を起点とした細胞内の張力に影響するために、 C_2C_{12} の弾性率と初代培養筋細胞の弾性率と同じであるという結論には至らない。

Truskey らの報告⁹⁾によると、単核の C_2C_{12} 細胞は約 10 kPa の弾性率を示し、分化誘導後の筋細胞では最大 45 kPa を示した。また、肝細胞の弾性率は約 10 kPa という報告¹⁰⁾がある。これらの弾性率に比べると、本研究で得られた初代培養筋細胞の弾性

率は約 1/10 の値である。この原因の一つにフォースカーブ測定に用いたカンチレバー探針の形状やバネ定数が異なることが考えられた。本研究で使用したカンチレバーの先端角度が今までに使用されているどのレバーよりも狭く、またバネ定数は 10 倍程度高い。さらに、バネ定数の補正も行っておらず、メーカーの公称値を使用したために、弾性率が低く算出された可能性がある。しかし、サブナノやナノメートルオーダーでのレオロジー解析において、数値の絶対値を求めることは煩雑な作業を経る必要があるために非常に困難である。研究の目的にもよるが、絶対的な弾性率を求めることは特段重要なことではない。本研究においては、弾性率として算出された値が比較対象物の弾性率と差異があることが判別できれば良いと我々は考えている。

Figure 5 に示したように、初代培養筋細胞の弾性率は培養日数に伴い増加し、特に培養 3 日目を境に有意に高くなっていった。ストレスファイバーならびに中間系フィラメントは培養日数に伴い徐々に発達し (Figure 6)、培養 3 日目には筋原線維の幼若な線維構造が見られる (Figure 7)。このことは弾性率が有意に高くなった時期とよく一致している (Figure 5)。 C_2C_{12} は分化を誘導して 6 日目に有意に弾性率が増加しており、Truskey らはアクチンフィラメン

トを脱重合させるサイトカラシンDやミオシンのATPase活性を阻害する2,3-butanedione 2-monoxime (BDM)を使用して、筋細胞の分化に伴う弾性率の増加はアクチンとミオシンの細胞骨格構造の形成やそれらの相互作用の結果として生じていると考察しており、細胞中の筋原線維構造との関係には言及していない⁹⁾。しかし、筋原線維の主要構成タンパク質はミオシンとアクチンであり、サイトカラシンDやBDMで処理したことによって、彼らの研究においても幼若であった筋原線維構造が壊れている可能性は高い。いずれにしても、細胞内部の骨格構造が筋細胞自体の硬さに影響していることは間違いない。近年では細胞の硬さと細胞骨格との関わりが重要視され、様々な細胞の生理現象がこれまでの液状因子(増殖因子等のシグナル)だけではなく、細胞の硬さや細胞が発生する機械的な力という物理因子によっても制御されていることが明らかされてきた。筋細胞に関しては、Englerらが非常に興味深い報告⁹⁾を行っている。彼らは筋細胞上にC₂C₁₂を播種して培養する系と線維芽細胞上に播種した系でC₂C₁₂が分化する様子を観察した。その結果、筋細胞上に播種したC₂C₁₂は規則正しい横紋を持つ筋原線維構造を筋管細胞内部に形成したのに対して、線維芽細胞の系では分化した筋管細胞中に筋原線維の横紋構造が形成されていなかった。筋細胞の硬さは12-15 kPaであるのに対して線維芽細胞の硬さは2-5 kPaであり、彼らはこの硬さの違いが筋細胞の分化速度に影響を及ぼしているとし、筋細胞の分化には適切な接着基盤の硬さが存在すること、ならびに分化機構は基盤の硬さと細胞の接着張力によって制御されているとしている。

我々は、これら筋細胞の力学的な生理現象の解明は、再生医療等の医学分野だけではなく、食肉生産という畜産領域においても、産肉性の向上といった技術革新につながると考えている。本研究によって、初代培養筋細胞の硬さ計測だけではなくAFMによる観察が可能になったことは、筋細胞の弾性率と細胞骨格構造と関係を明らかにする上で非常に重要である。今後は、先行研究⁹⁾の筋細胞の弾性率との差異に関して検討していく必要がある。上述したように、株化筋細胞であるC₂C₁₂と初代培養筋細胞では、基盤との接着力が異なるために細胞に生じる張力も異なることが予想される。基盤との接着力が低い初代培養筋細胞の弾性率が低いことは力学的に矛盾しない結果であるが、さらに調査を進めなければならない。また、筋細胞のような紡錘形状物をAFMで測定するためには、カンチレバー先端が長く開き角の

狭いレバーが必要であるが、これらの条件を満たすレバーでは、バネ定数が高くなってしまい力学測定に不都合が生じる。できるだけ低いバネ定数(0.1 N/m以下)で共振周波数が高く(30 kHz以上)、さらに先端の開き角と高さの条件を満たすカンチレバーは今のところ存在しない。筋細胞の分化過程の形態観察と弾性率計測を同一細胞中で行い、細胞骨格構造との関係を明らかにするためには、上述したカンチレバーの開発が必要不可欠である。

References

1. Bischoff, R. 1997. Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells. *Dev. Dyn.* 208: 505-515.
2. Robertson, T. A., Maley, M. A., Grounds, M. D., and Papadimitriou, J. M. 1993. The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. *Exp. Cell Res.* 207: 321-331.
3. Tatsumi, R., Liu, X., Pulido, A., Morales, M., Sakata, T., Dial, S., Hattori, A., Ikeuchi, Y., and Allen, R. E. 2006. Satellite cell activation in stretched skeletal muscle and the role of nitric oxide and hepatocyte growth factor. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 290: C1487-1494.
4. Tatsumi, R., and Allen, R. E. 2004. Active hepatocyte growth factor is present in skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle Nerve* 30: 654-658.
5. Chen, C. S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G. M., and Ingber, D. E. 1997. Geometric control of cell life and death. *Science* 276: 1425-1428.
6. Chicurel, M. E., Chen, C. S., and Ingber, D. E. 1998. Cellular control lies in the balance of forces. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 232-239.
7. Wells, R. G., and Discher, D. E. 2008. Matrix elasticity, cytoskeletal tension, and TGF-beta: the insoluble and soluble meet. *Sci. Signal.* 1: pe13.
8. Engler, A. J., Griffin, M. A., Sen, S., Bonnemant, C. G., Sweeney, H. L., and Discher, D. E. 2004. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J. Cell Biol.* 166: 877-887.
9. Collinsworth, A. M., Zhang, S., Kraus, W. E., and Truskey, G. A. 2002. Apparent elastic

- modulus and hysteresis of skeletal muscle cells throughout differentiation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283: C1219-1227.
10. Bhadriraju, K., and Hansen, L. K. 2002. Extracellular matrix- and cytoskeleton-dependent changes in cell shape and stiffness. *Exp. Cell Res.* 278: 92-100.
 11. Nagayama, M., Haga, H., and Kawabata, K. 2001. Drastic change of local stiffness distribution correlating to cell migration in living fibroblasts. *Cell Motil. Cytoskeleton* 50: 173-179.
 12. Kim, H., Arakawa, H., Osada, T., and Ikai, A. 2003. Quantification of cell adhesion force with AFM: distribution of vitronectin receptors on a living MC3T3-E1 cell. *Ultramicroscopy* 97: 359-363.
 13. Iwasaki, T., Washio, M., and Yamamoto, K. 2005. Atomic force microscopy of thermally treated myosin filaments. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4589-4592.
 14. Iwasaki, T., Washio, M., Yamamoto, K., and Nakamura, K. 2005. Rheological and morphological comparison of thermal and hydrostatic pressure-induced filamentous myosin gels. *J. Food Sci.* 70: E432-E436.
 15. Allen, R. E., Rankin, L. L., Greene, E. A., Boxhorn, L. K., Johnson, S. E., Taylor, R. G., and Pierce, P. R. 1991. Desmin is present in proliferating rat muscle satellite cells but not in bovine muscle satellite cells. *J. Cell Physiol.* 149: 525-535.
 16. Seneddon, I. N. 1965. The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *Int. J. Eng. Sci.* 3: 47-57.
 17. Haga, H., Nagayama, M., Kawabata, K., Ito, E., Ushiki, T., and Sambongi, T. 2000. Time-lapse viscoelastic imaging of living fibroblasts using force modulation mode in AFM. *J. Electron Microsc.* 49: 473-481.
 18. Rotsch, C., and Radmacher, M. 2000. Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study. *Biophys. J.* 78: 520-535.
 19. Haga, H., Sasaki, S., Kawabata, K., Ito, E., Ushiki, T., and Sambongi, T. 2000. Elasticity mapping of living fibroblasts by AFM and immunofluorescence observation of the cytoskeleton. *Ultramicroscopy* 82: 253-258.
 20. Wang, N., and Stamenovic, D. 2000. Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stiffening, and growth. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279: C188-194.

Abstract

This study aimed to elucidate rheological properties of rat myoblasts during differentiation using an atomic force microscope (AFM). Satellite cells of rat skeletal muscle were isolated and cultured. Anti-desmin immunoglobulin G-positive cells were counted and regarded as myoblasts. Dimensions (height, length, width) of myoblasts were $3 \times 30 \times 10 \mu\text{m}$ on the first day of culture, and $3 \times 40 \times 20 \mu\text{m}$ on the 2nd day. Myotubes appeared in the myoblast after 3 days, and the myoblast kept growing. Elasticity of the myocyte on days 1, 2, 3 and 5 was $1.27 \pm 0.36 \text{ kPa}$, $1.77 \pm 0.58 \text{ kPa}$, $2.32 \pm 0.93 \text{ kPa}$, and $5.92 \pm 2.27 \text{ kPa}$, respectively. Density of actin and desmin filaments in the myocyte increased with culture progress. At the same time, the formation of myofibrils in the myocyte was observed under transmission electron microscopy. Immature myofibrils were expressed in myotubes after 3 days of culture. These results suggest that formation of the cytoskeleton, such as actin and desmin filaments, as well as myofibrils during development of myoblasts causes the increased elasticity of myoblasts.