

## 新規蛍光プローブ探索のための C2C12 細胞を用いた機能性組織の再構築†

友 亮人\*, 神 隆\*\*, 野村保友\*, \*\*

### Functional reorganization of excitable cell culture system for screening novel fluorescent probes in NIR-II†

Ryoto Tomo\*, Takashi Jin\*\*, Yasutomo Nomura\*,\*\*

The second near-infrared window ranged between 900 and 1400 nm, namely NIR-II, has advantages for deep tissue imaging with extrinsic fluorophores due to lacking autofluorescence, low light absorption, and reduced scattering. Most of the proposed probes were used for labeling with antibodies. As a new application, we plan to monitor electrical activity in a living tissue noninvasively using membrane potential dye with NIR-II fluorescence. So we need the excitable cell culture system to screen candidates of such dyes. C2C12 skeletal myoblasts were morphologically differentiated to myotubes under the optimal conditions, and the electrical stimulation-induced contraction of the myotubes was monitored optically. This myotube system would permit screening membrane potential dyes in NIR-II.

**Key words** : C2C12, myoblasts, myotubes, image processing, morphological differentiation, electrical stimulation, contractile activity, functional reorganization

#### 1 はじめに

第二近赤外領域 (900-1400 nm) は生体組織の吸収・散乱が極めて弱く, 自家蛍光がほとんどないことから外来蛍光色素を用いた無侵襲蛍光イメージングに興味を持たれている<sup>1)</sup>. そのため機能性蛍光プローブがいくつか提案されたが, 診断への応用をめざして各種抗体が第二近赤外光で蛍光ラベルされた<sup>2)</sup>. 新たな用途としてこの第二近赤外領域の蛍光を用いて, 生体電気活動を高い空間分解能で解析することを目指した. 第二近赤外領域の候補蛍光色素の中から膜電位感受性を持つものを探索するための評価実験系が求められた. 生体組織を構成する細胞の興奮性には脱分極が数百 ms 持続する心筋タイプと数 ms と速い応答を示す神経や骨格筋タイプがある. 心筋細胞や神経細胞の初代培養は機能面では大変優れているが<sup>3)</sup>, 多数の候補化合物を評価する大規模検索に利用する場合には代替サンプルが求められる. iPS 細胞も機能的には優れているがコストの問題がある. 本研究では新規蛍光プローブ探索用の機能性組織を構築するための第一歩として, 速い脱分極を示す骨格筋由来の細胞株の分化特性を検討した. マウス大腿筋由来の株化細胞 C2C12 は未分化の筋芽細胞の状態で無限に増殖し, 分化誘導刺激を与えると細胞融合して細長い筋管細胞へ

と形態的に分化することが知られている<sup>4)</sup>. 最近この筋管細胞を数時間にわたり電気刺激するプレコンディショニングによりサルコメア形成が促され電気刺激により収縮することが報告された<sup>5)</sup>. ここでは C2C12 の形態的および機能的分化を定量的に解析し, 新規蛍光プローブ探索用の機能性組織としての可能性を検討した.

#### 2 実験

##### 2・1 細胞培養

理研セルバンクから購入した凍結 C2C12 を解凍後, 10 %ウシ胎児血清および抗生物質 1 %を含む DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培地を用いて 37°C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベータで培養し増殖させた. コンフルエントにした後, 分化誘導培地 (2%ウマ血清, 1%非必須アミノ酸および抗生物質 1%を含む DMEM) に変更して毎日培地を交換した.

細胞観察には, 倒立型リサーチ顕微鏡 (Olympus IX71), カメラ (Olympus DP21, 25 fps 800×600, 8 bit) を用いた. 電気刺激は IonOptix 社の C-Pace と C-Dish を用いた. 炭素電極を 35mm ディッシュの培地に沈めて, 細胞近傍に固定した. C2C12 筋管細胞をバイポーラ刺激した.

† 原稿受理 平成30年2月28日 Received February 28, 2018

\* システム生体工学科 (Department of Systems Life Engineering)

\*\* 理化学研究所生命システム研究センター(RIKEN Quantitative Biology Center)

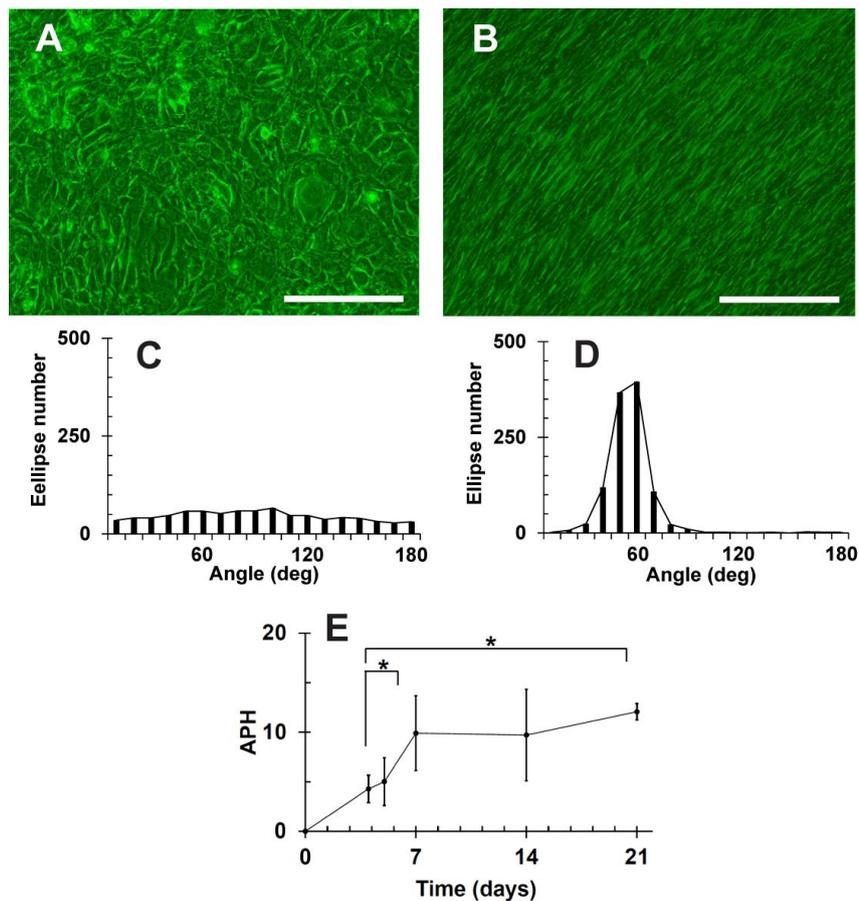


Fig.1 Morphological differentiation of C2C12 from myoblasts to myotubes.

A: Phase contrast image of C2C12 myoblasts in the confluent culture. B: C2C12 myotubes after 21 days under the culture with a differentiation-induced medium. Scale bar shows 200  $\mu\text{m}$ . C: Angular histogram of ellipses fitted to cellular contours in A (*see text*). D: The histogram of B. E: Time course of the amplitude per half-width (APH) of the histograms. \* $p < 0.05$ .

## 2・2 画像解析

C2C12 の形態的な分化を定量的に評価するために、ディッシュ当たり異なる7つの領域を無作為に選択し、細胞の位相差像を20倍対物レンズにより取得した。ImageJを用いて画像全体を二値化して細胞の輪郭を強調した。その輪郭に対して楕円フィッティングを行い、楕円長軸の角度分布のヒストグラムにした。ディッシュにランダムな向きに接着していた筋芽細胞が細胞融合して一定方向に配向した細長い筋管細胞へ分化することを定量的に解析するためにヒストグラムのピークを半値幅で割った値 APH (amplitude per half-width) を計算し、 $t$  検定を行った。

C2C12 の機能的な分化を定量的に評価するために、形態解析と同様に位相差像を記録した。電気刺激により誘発された収縮を評価するために、ImageJを用いて収縮部位に region of interest (ROI) を設定し、その平均輝度の経時変化の時系列データを取得した。それを周波数解析し、フーリエスペクトルのピーク周波数を収縮周波数とした。

## 3 結果と考察

### 3・1 形態的分化

Fig.1A は分化誘導直後の C2C12 の形態である。ほとんどの筋芽細胞同士が互いに接触するほど密度の高いコンフルエントな状態であった。細胞の接着状態は全くランダムで何ら規則性や方向性はないように見えた。しかし増殖培地から分化誘導培地に変更すると、細胞の接着状態に規則性が現れ、一方向へ配向する傾向が強まっていった。培地変更後21日の C2C12 の接着の状態を Fig.1B に示す。このディッシュでは細胞の向きが左下から右上の方向に並んでいるように見えた。一本ずつ見ると細長い形状で細胞融合が進んだこと示唆した。Fig.1A の細胞の位相差像を二値化して、細胞の輪郭を強調し楕円をフィッティングすると、ほとんどの細胞に楕円をうまくフィッティングすることができた。各楕円の長軸が水平軸となす角度のヒストグラムを Fig.1C に示す。どの角度にも一様に分布したため明らかなピークはなかった。しかしながら Fig.1D に示すように分化誘導21日の Fig.1B の細胞の角度分布のヒストグラムではほとんど

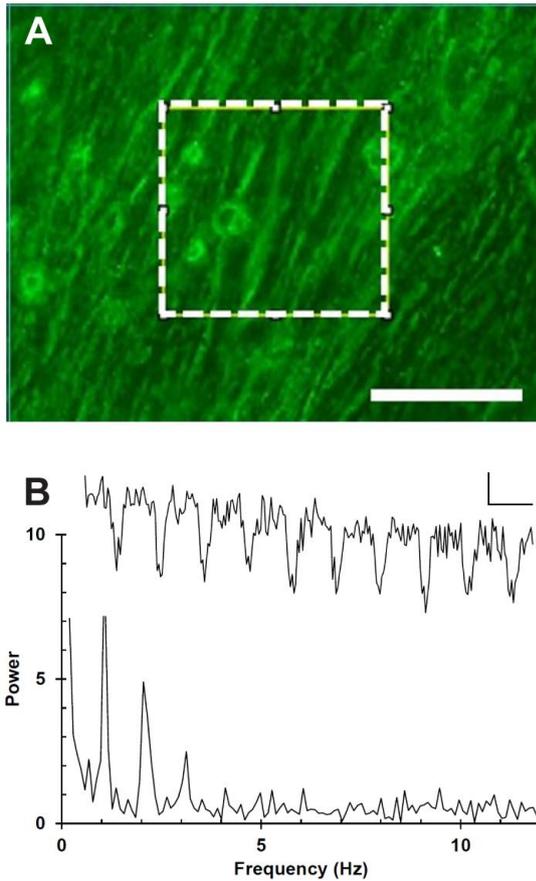


Fig.2 Contractile activity obtained by the electrical preconditioning. A: Phase contrast image of C2C12 myotubes after the preconditioning. Scale bar shows 50  $\mu\text{m}$ . B: Fourier spectra of time-course of average intensity (insertion) observed from ROI (dotted line area in A). Horizontal and vertical scale bars show a time (1 second) and an intensity (0.1 au), respectively. The preconditioning was an electrical stimulation for 2 hrs with 1 Hz biphasic pulses. The pulse width and amplitude were 4 ms and  $\pm 40$  V, respectively.

の細胞が 60 度程度に傾いて接着していたことが明らかになった。角度そのものは撮影時のディッシュの向きに依存するので、全細胞の中で一方に配向した細胞の比率を分化の指標とすることが適切であった。その比率はヒストグラムのピークの幅に対する高さの比率 (APH) に反映されると考えた。Fig.1E に示すように APH は分化誘導培地に交換後、時間経過とともに形態が変化していくことをうまく定量解析できたことを表していた。形態的には分化誘導培地に変更して 7 日間ほどで筋管細胞へ分化し、その後さらに分化誘導培地での培養を維持しても形態にはあまり変化はなかった。

### 3・2 機能的分化

分化誘導培地で培養を 7 日間ほど維持すると、形態的に筋管細胞への分化が確認されたため、文献<sup>5)</sup>に従って  $\pm 40$  V、パルス幅 4 ms のバイポーラ刺激を 1 Hz で 2

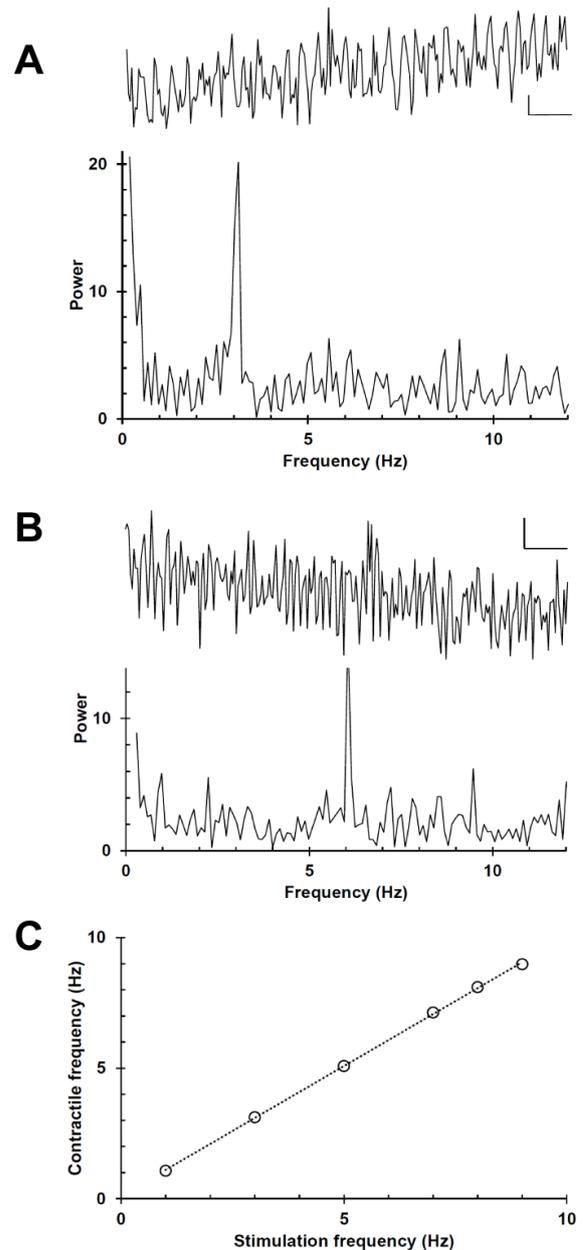


Fig.3 Effect of stimulation frequency on contractile activity. A: Fourier spectra of intensity fluctuation (insertion) on 3 Hz stimulation. Horizontal and vertical scale bars show a time (1 second) and an intensity (0.2 au), respectively. B: 6 Hz. C: Summary from 1 to 10 Hz. Dotted line shows the regression line ( $y = 0.99x + 0.11$ ,  $r^2 = 0.9997$ )

時間加えて、インキュベータ内でプレコンディショニングを行った。このプレコンディショニングによりサルコメア形成が促進されることが指摘されている。しかしながら文献のように収縮することはなかった。そのため別のディッシュに対して分化誘導培地での培養を延長した。14 日目にプレコンディショニングを行っても電気刺激に対する応答は観察されなかったが、21 日にわたり分

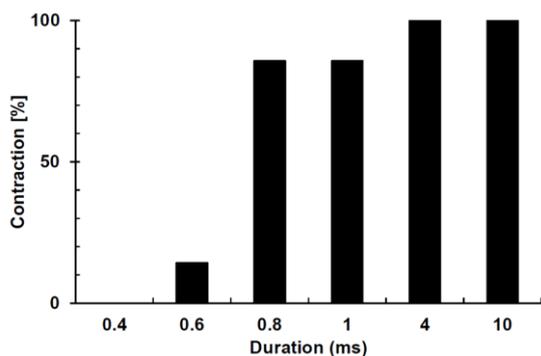


Fig.4 Dependency of pulse duration on contractile activity in C2C12 myotubes.

化誘導培地で培養したディッシュの細胞に対してプレコンディショニングを行った後では電気刺激に応じて収縮した。プレコンディショニング後にインキュベータから取り出して、顕微鏡下で 40 V, パルス幅 4 ms のバイポーラ刺激を 1 Hz で印加した時の応答の典型例を Fig.2 に示す。ROI の平均輝度の時系列データはほぼ 1 秒ごとに周期的に変動した。フーリエ解析すると、1 Hz に基本波, 2,3 Hz 付近には第二, 第三高調波が明瞭に現れ, 4 Hz 付近にも第四高調波の痕跡があり, 輝度変化に極めて規則正しい周期現象が現れていたことが示唆された。同様に 28 日にわたり分化誘導したディッシュの細胞もプレコンディショニングにより電気刺激に応じて収縮した。しかし印加した電場の範囲内全域で収縮することは少なく, 限られた範囲でのみ収縮することが多かった。

### 3・3 収縮特性

分化誘導培地で 2 1 日にわたり培養を維持し, プレコンディショニングすると 1 Hz の電気刺激に対して収縮することが確認されたので, その収縮特性を刺激周波数と刺激時間の 2 点から詳細に検討した。刺激条件の中で刺激周波数だけ 3 Hz にした時の典型例を Fig.3A に示す。その挿入図から 1 Hz より収縮が早まったことはわかる。Fig.3A の周波数スペクトルでは 3 Hz に明らかなピークが現れた。しかしながら 1 Hz の時のような高調波はなかったことから周期の正確性は低下したかもしれない。Fig.3B では 6 Hz で刺激した時の典型例を示す。3 Hz と同様に 6 Hz においても周波数スペクトルに明らかなピークがあり, それは刺激周波数の 6 Hz に一致した。9 Hz までは刺激周波数に一致して収縮できたが, 10 Hz では追従できなかった (Fig.3C)。人体での骨格筋刺激では大腿筋を構成している type II 繊維において 10-25Hz において不完全収縮となっていることが報告されていることと矛盾しない<sup>6)</sup>。

次に刺激条件の中で刺激時間以外は変えずに, その収縮活性の及ぼす影響を検討した (Fig.4)。4 ms から 0.4 ms に短縮すると, 筋管細胞は電気刺激に対して反応しなかった。0.6 ms では 7 ディッシュの中で 1 ディッシュだけが電気刺激に対して反応した (14%)。0.8-1ms では 86%であった。4ms 以上であれば全てのディッシュで収

縮が確認できた。コラーゲン処理をしたディッシュに播種した C2C12 ではパルス幅 0.6 ms 以上で収縮が確認された報告があり, Fig.4 と矛盾しなかった<sup>7)</sup>。コラーゲン処理は C2C12 の接着および分化を促進することが報告されているが, 本研究ではコラーゲン処理していないことから, ディッシュへのコラーゲン処理は C2C12 の構造的分化に影響を与えるが, 機能的分化には影響を与えないことが示唆される。

## 4 結論

C2C12 筋芽細胞は分化誘導培地で 1 週間培養すれば形態的には筋管細胞への十分な分化が誘導された。しかしそれだけでは機能的な分化には不十分であった。従来の報告と異なり, 3 週間以上分化誘導培地で培養すれば電氣的なプレコンディショニングで収縮活性を獲得できることが明らかになった。この活性は *in vivo* と同様の刺激周波数依存性と刺激時間依存性を示した。

## 5 展望

本研究で用いた C2C12 筋管細胞は従来の初代培養細胞や iPS 細胞で指摘された問題点を解決できる。この C2C12 株化細胞から機能的に再構築された筋管細胞群に対して第二近赤外光学窓の新規色素を導入すると膜電位感受性を詳細に検討できるであろう。まずはイメージングに先立って, 再構築された骨格筋組織 C2C12 の活動電位を第二近赤外光学窓で十分な感度を持つフォトダイオードを用いた定点観察可能な実験系を組み立てる予定である。

## 参考文献

- 1) G. Hong, A.L. Antaris, and H. Dai, Near-infrared fluorophores for biomedical imaging, *Nature Biomed. Eng.*, **1**, 0010 (2017).
- 2) S. Tsuboi, et al., Immunoglobulin binding (B1) domain mediated antibody conjugation to quantum dots for in vitro and in vivo molecular imaging. *Chem. Commun.* **53**, 9450-9453 (2017).
- 3) Z. Feng, et al., An electro-tensile bioreactor for 3-D culturing of cardiomyocytes. A bioreactor system that simulates the myocardium's electrical and mechanical response in vivo. *IEEE Eng Med Biol Mag.* **24(4)**, 73-79 (2005).
- 4) M.A. Lawson, et al., Differentiation of myoblasts in serum-free media: effects of modified media are cell line-specific, *Cells Tissues Organs*, **167(2-3)**, 130-137, 2000
- 5) H. Fujita, et al., Accelerated de novo sarcomere assembly by electric pulse stimulation in C2C12 myotubes, *Exp. Cell Res.*, **313**, 1853-1865 (2007)
- 6) 渡辺彰吾他, “骨格筋の変位 MMG 強縮過程と筋繊維タイプの関係” *バイオメカニズム* **19**, 23-33 (2008)
- 7) 赤土和也他, “骨格筋培養のための機械刺激負荷に関する研究” *生体医工学シンポジウム* **47(2)**, 231-236 (2009)