

### 線維芽細胞を介した心筋細胞集団の同期過程 とペースメーカー要因の探索

宮越, 昭太 / MIYAKOSHI, Shota

---

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学・工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編 / 法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編

(巻 / Volume)

58

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

2

(発行年 / Year)

2017-03-31

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00014374>

# 線維芽細胞を介した心筋細胞集団の同期過程と ペースメーカー要因の探索

SYNCHRONIZATION BETWEEN CARDIOMYOCYTE CLUSTERS THROUGH FIBROBLASTS  
AND SEARCH FOR PACEMAKER FACTORS.

宮越昭太

Shota MIYAKOSHI

指導教員 金子智行

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻修士課程

In regenerative medicine of the heart, synchronization between artificial cardiac sheet and original cardiac tissue is important. However, this synchronization process is unclear. Therefore, we investigated the synchronization process between chicken embryo-derived cardiomyocyte clusters through fibroblasts. To fabricate two sets of large cardiomyocyte clusters with different beating rate, we used agarose micro chamber (AMC) with micro fabrication technology. These clusters were connected through fibroblasts by additional fabrication during cell culture to analyze the synchronization process by coefficient of variation (CV) of delay time in field potential conduction. In conclusion, the clusters of cardiomyocytes were synchronized if the distance of fibroblasts was within about 300  $\mu\text{m}$ . It was found that the synchronization becomes unstable when cardiomyocyte clusters were connected through fibroblasts. It was shown that the synchronization of cardiomyocyte clusters might have a different mechanism from that of tissue or single cardiomyocytes.

**Key Words** : cardiomyocytes ,fibroblasts ,synchronization ,pacemaker ,agarose micro chamber

## 1. 緒言

心筋細胞はそれぞれ相互作用しあい、電気的な結合によって拍動が同期することが知られている。しかし、心筋細胞の同期メカニズムは詳しく解明されていない。その同期メカニズムが解明されることによって、心臓の再生医療の研究において正確で安全な治療に貢献できると考えている。我々はニワトリ胚由来の心筋細胞を用い、アガロースマイクロチャンバー(AMC) [1]により2組の心筋細胞集団の作製に成功した。心筋細胞集団の2組は細胞培養中に追加のアガロースマイクロ加工をし、その部分を線維芽細胞が伸長していくことによって接続することができる[2]。その際の、細胞集団間の距離・細胞集団サイズを変更した場合の同期過程を調べた。同期過程の分析には、オンチップマルチ電極アレイ (MEA) システムを使用し、細胞外電位を10分毎に1分間測定した。また、データの解析にはMatLabを使用し、拍動間隔・拍動のゆらぎ・拍動遅延時間(Delay time)を主な指標とし、同期過程を調べた。

## 2. 実験方法

### (1) AMCの作製

コラーゲンコートをしたMEA電極上にアガロースをコーティングし、アガロース加工装置によりアガロースを溶解させることで、細胞の接着部・非接着部を作製した。アガロース加工によって細胞集団サイズ・細胞集団同士の距離をコントロールした(図1)。

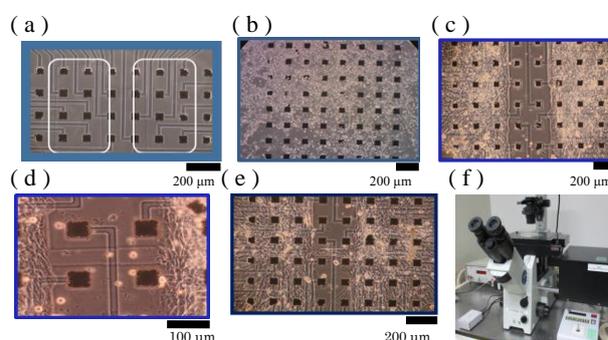


図1. AMC上の2組の心筋細胞集団

AMC(a)上に心筋細胞を分散培養(b)し、2組の心筋細胞集団の構築(c)に成功。アガロースマイクロ加工(d)により線維芽細胞が伸長し、細胞集団同士を接続(e)した。AMCの加工にはアガロース加工装置(f)を用いた。

## (2)測定と解析

MEA システムを用いて心筋細胞集団の細胞外電位を測定し、Na<sup>+</sup>流入のピークから次の Na<sup>+</sup>ピークまでの Inter Spike Interval (ISI (s))を拍動間隔とした。また、拍動のゆらぎを示す指標として Coefficient of Variation (CV (%)) = SD/mean × 100 を用い、CV = 10 % 以内であればその拍動は安定しているとした。同期の検証には、拍動遅延時間(Delay time)を解析することで評価し、Delay time の CV = 10 % 以内の時、その拍動は同期していると評価し、安定しているものとした(図 2)。また、Delay time の CV で判断し兼ねる場合は、波形データを観察することで評価した(図 3)。

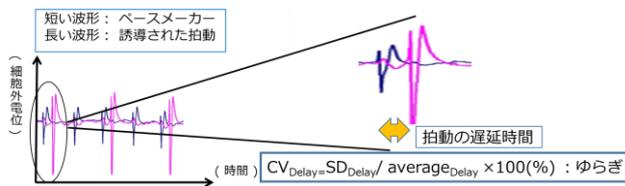


図 2.拍動の遅延時間

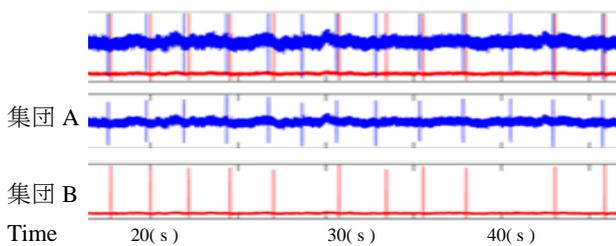


図 3.同期後の拍動波形の一例

MatLab による解析画面で左右の細胞集団をそれぞれ表している。拍動の遅延時間がゆらいでいなければ、安定した同期と言えるが、20 秒~40 秒辺りで同期した拍動が遅延している為、不安定になっていることが分かる。

## 3. 結果と考察

### (1)同期の条件と同期した時の拍動

実験結果より、線維芽細胞を介しての同期は線維芽細胞の距離が 300 μm 以内であれば同期することと、同期後の拍動は安定が継続するのではなく不安定になることがわかった。Delay time の解析結果から CV が 25 h 付近で減少していることにより同期し、39 h で一度不安定になり、43 h 以降は不安定な状態が継続した(表 1, 図 4)。

表 1.細胞集団の Delay time 解析

time (h)	22	23	24	25	26	28	29
Delay time ave (s)	0.14	0.16	ノイズ	0.062	0.022	0.028	0.027
SD	0.042	0.034	により、	0.0049	0.0005	0.0006	0.00077
CV	30	21	解析不可	8	2.1	2	2.9
time (h)	38	39	40	41	42	43	
Delay time ave (s)	0.03	0.039	0.037	0.041	0.04	0.19	
SD	0.0014	0.007	0.0035	0.0007	0.005	0.11	
CV	4.8	18	9.4	1.7	12	56	

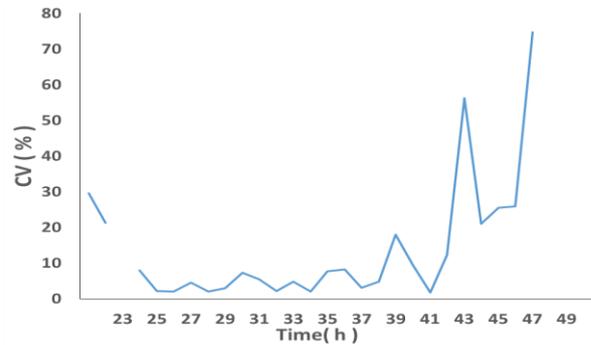
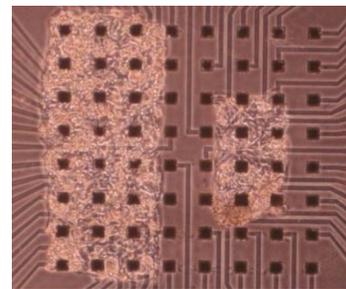


図 4. Delay time の CV (%) による同期検証

### (2)ペースメーカー要因

心筋細胞集団同士の同期において、拍動の主導権を握る要因、つまりペースメーカーとなる要因はどこにあるのかを、同期したデータを用いて解析した結果、拍動の速さ・安定度は関与せず、心筋細胞集団のサイズの違いによるものである可能性が示唆された(図.5)。



200 μm

図 5.異なるサイズの心筋細胞集団

## 4. 結言

本研究により、線維芽細胞を介しての心筋細胞集団の同期に成功した。線維芽細胞は心筋細胞集団の活動電位を伝播するが、その距離が長いと同期はせず、同期後の拍動は不安定になることが観察された。また、ペースメーカー要因は細胞数に起因する可能性が示唆された。

**謝辞：** 本研究は金子智行教授のご指導を始め本研究で使用した MEA システムをご提供くださった早稲田大学安田賢二教授、MatLab 解析ソフトをご提供下さった青山学院大学三井敏之教授、貴重なご意見をいただいた東京医科歯科大学野村典正准教授のご協力のもとで行われました。深く感謝を申し上げます。

## 参考文献

- 1) K. Kojima *et al.*, *J.Nanobiotechnology* (2005) 3:4
- 2) T. Kaneko *et al.*, *J.Nanobiotechnology* (2011) 9:21