

心臓組織片と分散培養筋細胞の拍動同期過程

NIHEI, Chiho / 二瓶, 千穂

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学研究科

(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

(巻 / Volume)

59

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

2

(発行年 / Year)

2018-03-31

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00021628>

心臓組織片と分散培養心筋細胞の 拍動同期過程

SYNCHRONIZATION PROCESS OF BEATING BETWEEN
CARDIAC TISSUE PIECES AND DISPERSED CULTURE OF CARDIOMYOCYTES

二瓶千穂

Chiho NIHEI

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

Heart is a systematic organ such as sinoatrial nod working as pacemaker. To validate the robustness of network for beating, cardiac tissue pieces of chick embryos (E7-9) were contacted dispersed culture of cardiomyocytes derived from chick embryos (E7) on micro electrode arrays, and I measured extracellular potential by multi electrode array (MEA) system. In analyzing beat synchronization, I calculated the inter-spike interval (ISI) as beating intervals. For verification of beat synchronization, I took difference between the beat time of the tissue pieces and the beat time of the cell cluster. In the time to beat synchronization, tissue pieces of ventricle were earlier compared with tissue pieces of atrium, but there were no significance. Furthermore, the pacemaker of beat at synchronization didn't have key difference in atrium and ventricle. From the results, it was suggested that ISI of the pacemaker tended to stable and short than followed the other before the time of synchronization regardless of tissue and cell cluster. However, the pacemaker of beating wasn't constantly same and interchanged during measurement the extracellular potential. Thus, it can't be stated unconditionally that superiority or inferiority in robustness of beating determine about cardiac slice pieces and cell cluster.

Key Words : cardiomyocytes, tissue, synchronization, robustness, micro electrode array

1. 緒言

心臓はペースメーカー領域である洞房結節を有しており、組織的な臓器である[1]。心臓が正常に動くには心筋細胞同士が電気的なネットワークを形成し心臓全体の拍動が同期する必要があるが、心筋梗塞などで心筋細胞が壊死すると壊死部分のポンプ機能は失われる。心筋細胞は分裂能・自己修復能がないため、新たな治療法として、iPS細胞由来の心筋細胞シートを患部に移植し、心臓機能を回復させる研究が進んでいる。心臓機能の回復には心筋細胞シートと移植先の心臓の拍動が同期する必要があるが、そのメカニズムは不明で重要な研究課題となっている。これまで本研究室では、単一細胞同士[2]、細胞集団同士などの拍動同期メカニズムが研究されてきた。本実験では、明らかになっていない心筋細胞集団と心臓組織片の拍動同期のメカニズムを Multi Electrode Array (MEA) システムを用い細胞外電位を測定することで上記の課題にアプローチした。同期の検証にあたって、心臓組織片と分散培養した心筋細胞集団の拍動タイミングの差を解析し、どちらが拍動の主導権を握るのか、拍動ネットワークにおけるロバストネスを評価した。

2. 実験方法

(1) 心筋細胞の単離と心臓組織片の解剖

ニワトリ胚(E7)より単離した心筋細胞を MEA プローブの微小電極上に播種し、2日間培養した。ニワトリ胚(E7~9)の心臓組織片は心房・心室に分けて切り出してインキュベートしたのち、拍動しているものを微小電極上の約半分の領域に配置した。その後、直ちに MEA システムを用いて胞外電位を測定した(図1)。測定はインキュベーター内で1時間おきに1分間行った。

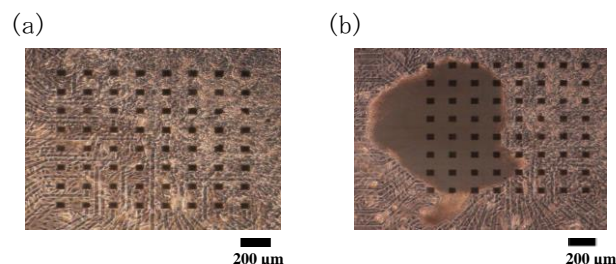


図1. 8×8の微小電極上の心筋細胞と心臓組織片
(a) 微小電極上に分散培養した心筋細胞集団。
(b) (a)の左側に心臓組織片を配置し、測定した。

(2) 細胞外電位の測定と解析

拍動同期を評価するにあたり、3つの指標を使用した。①細胞へのNa⁺流入ピーク間である Inter Spike Interval (ISI) (図 2(a))を拍動間隔とし、拍動の安定性を評価するため Coefficient of Variation (CV) (%) = SD / mean × 100 を用いた。②1分間あたりの拍動の Time lag (|細胞の拍動タイミング-組織片の拍動タイミング|) (図 2(b))と、③どちらが主導で拍動しているかの Pacemaker (細胞の拍動タイミング-組織片の拍動タイミング)を平均化して求めた。拍動の同期は ISI・ISI の CV と Time lag、実際の波形から判断し、Time lag については 0.1 s 以下の値が 3 時間以上続いた状態を同期とみなした。電極全体に細胞を播種した上から組織片を配置しているため、組織片のチャンネルには、組織片と細胞の 2 種類のピークが出る。細胞集団のピークから近いピークは細胞集団のピーク、細胞集団のピークから遠いもう一方のピークを組織片のピークとし、組織片と細胞集団の 2 チャンネルずつを FlexPro で解析した。

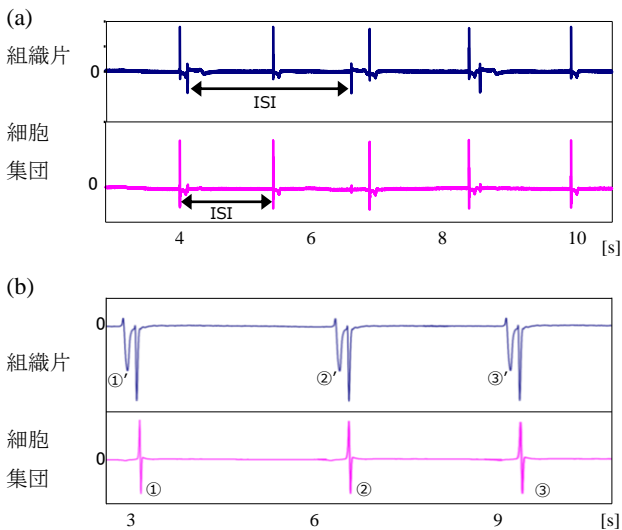


図 2. ISI と Time lag

(a) 組織片、細胞集団の各 ISI。 (b) Time lag。

|①-①'|のように算出した。

3. 結果と考察

(1) 心房・心室組織片による結果の差異

実験を行った心房・心室組織片の各 3 例において、心筋細胞集団との同期が観察された。同期までの時間は、平均すると心房組織片は 24.7 ± 8.1 時間、心室組織片は 12 ± 8.5 時間であった。心筋細胞単離の際、心房部分には血管が含まれるため主に心室細胞を使用しており、またギャップ結合を形成するコネクシンの種類も同じことから心室が速く同期した可能性が考えられる [3]。しかし、心房・心室組織片の同期時間に有意な差はなかった。

Pacemaker に関しても、心房・心室において明確な差異はみられなかった。

(2) 同期時の Pacemaker と同期後の安定性

同期前の ISI に着目すると、ISI が安定し、かつ ISI が速い方が同期時の Pacemaker となる場合が 4 例観察され (表 1)、Pacemaker 要因は ISI にあると示唆された。同期時・同期直後の Pacemaker は組織片・細胞集団のどちらかに統一されたが、その後は時間帯によって Pacemaker が交代する Pacemaker が 1 分間の中で入れ替わる現象が観察された (図 3)。よって、同期後における拍動ネットワークのロバストネスは必ずしもどちらかが強いわけではなく、組織片と細胞集団が拮抗あるいは相互作用していると考えられる。同期後の安定性を評価するため、組織片の 2 チャンネルに関し同期直後 3 h における Time lag と同期後 24~27 h における Time lag を mean ± SD で比較したところ大きな変動はなく、1 日後の同期状態は安定していると推察されるが、測定を続けると Time lag の値がばらつき不安定になるケースも観察された。本実験では最長でも 80 時間程度の測定だったため、長いスケールで測定し、拍動の安定性を検討する余地がある。

表 1. 結果のまとめ

	心房 1	心房 2	心房 3	心室 1	心室 2	心室 3
同期時間 (h)	20	33	30	4	11	21
Pacemaker	細胞	組織片	細胞	組織片	細胞	細胞
同期前の ISI 安定性	細胞	組織片	—	組織片	細胞	—
同期前の ISI の速さ	細胞	組織片	—	組織片	細胞	—
同期後 3h の Time lag (s)	0.038 ± 0.21	0.011 ± 0.00046	0.0071 ± 0.0022	0.016 ± 0.0070	0.088 ± 0.0048	0.020 ± 0.022
同期後 24~27h の Time lag (s)	—	0.025 ± 0.00059	0.010 ± 0.0013	0.023 ± 0.0024	0.072 ± 0.048	0.028 ± 0.0023

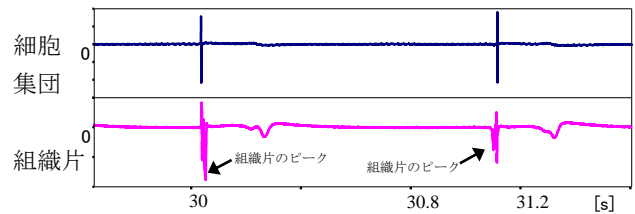


図 3. 同期後、Pacemaker が入れ替わった波形

4. 結言

分散培養した心筋細胞集団にはネットワークが形成されており、予めネットワークが構築されている組織片に対してもロバストネスを示すことが判明した。拍動同期時の Pacemaker に関しては、同期前における ISI の速さと安定性が関与することが示唆された。拍動同期後は、同期しつつも細胞集団と組織片で拍動の Pacemaker が入れ替わる現象が観察されたため、拍動において一概に主導権の優劣がつくとは言えないことが推察される。

参考文献

- 1) M.R. Boyett et al. (2000) *Cardiovasc Res*, **47**, 658-687
- 2) T. Kaneko et al. (2011) *Journal of Nanobiotechnology*, **9**:21
- 3) 神谷香一郎: *HEART's Selection* (2010), **42**, 9, 1127-1131