

擬似心臓モデルの再構成および電気生理学的性質の評価

Fujii, Koki / 藤井, 洸希

(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)

61

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

2

(発行年 / Year)

2020-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00022953>

擬似心臓モデルの再構成および電気生理学的性質の評価

RECONSTRUCTION OF CARDIAC TISSUE-LIKE CELL COMMUNITY AND EVALUATION OF ELECTROPHYSIOLOGICAL PROPERTY

藤井洸希

Koki Fujii

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

Cardiac tissue *in vivo* has a structure that cardiomyocytes (CMs) and fibroblasts (Fibs) are regularly oriented, while sarcomere structure has been found via cardiac cell sheet obtained by dispersed culture, being expanded to multi-directional and making random contacts bonding to CMs and Fibs. Therefore, there is an issue that they show the different functions such as contractile force and electrophysiological property. In this study, we reconstructed cardiac tissue-like structure on a substrate with agarose microchamber, where Fib network is localized between two linear CM networks, and conducted membrane potential measurement using multi electrode array system. Electrical characteristic of this cell community were evaluated in terms of inter-spike interval which is the time between subsequent action potentials of Na^+ influx, Coefficient Variation to evaluate beating stability, and conduction velocity as a new index of preclinical assay. As a result, the cell community of reconstructed cell structure resembled to cardiac tissue showed the most stable beating. Likewise, the result was achieved with the largest number of conduction velocity along the longitudinal axis of CMs pacemaker.

Key Words : cardiac tissue-like cell community, electrophysiological property, conduction velocity

1. 緒言

心臓内部では筋原線維が一定の方向に走向することで細胞全体の収縮方向が決定され、その収縮する方向に沿って心筋細胞が互いに接着している。これらの心筋細胞はギャップジャンクションを介して結合しており、電気的な興奮が伝搬することで心臓が収縮する。したがって心筋細胞同士が接着して形成する心筋繊維には配向性が存在する^{1,2)}。また、実際の心臓に含まれる心筋細胞は全体の30~40%であり、これらの心筋細胞は残り60~70%を占める線維芽細胞や内皮細胞と相互作用をしながら心臓を絶えず維持・修復している³⁾。したがって、心臓の機能を理解するために心筋細胞と線維芽細胞の相互作用を理解することが重要である。薬剤スクリーニングにおいて、分散培養された心筋組織を用いるよりも、実際の心筋細胞の配列を再現した組織を用いる方が迅速かつ正確な非臨床試験に貢献できると考えられる。

本研究では、アガロースマイクロチャンバー (AMC) を用いて、実際の心臓と類似した構造をとるようにそれぞれの細胞の培養エリアや配向性をコントロールした擬似心臓モデルを再構成した。さらに、Multi Electrode Array (MEA) システムを用いて再構成した細胞集団の機能の評価を行った。

2. 実験方法

(1) 1細胞レベルの擬似心臓モデルの再構成および蛍光染色

コラーゲン溶液およびアガロースゲルをコートしたディッシュに赤外線レーザーを使用して3列のAMCを作製した。マイクロピペットを用いて上下の2列には心筋細胞 (Fig. 1A) を、中央の列には線維芽細胞 (Fig. 1B) を1細胞レベルで配置した。3日間培養した後 (Fig. 1C)、アクチンと核を蛍光染色し構造を観察した (Fig. 1D)。

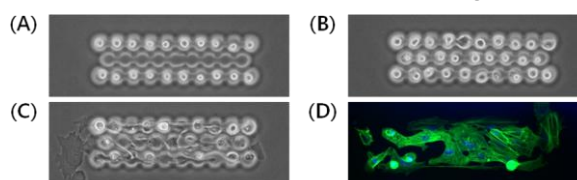


Figure 1 1細胞レベルで再構成した擬似心臓モデルの位相差顕微鏡観察 (A) ~ (C) および蛍光顕微鏡観察 (D) 心筋細胞を両端のAMCに配置 (A) したあと線維芽細胞を中央に配置 (B) した。3日培養した細胞コミュニティ (C) のアクチンを緑で、核を青で染色 (D) し、構造を観察した。Scale bar=100 μm

(2) MEDプローブ上に再構成した擬似心臓モデルの細胞

外電位測定および評価

コラーゲン溶液およびアガロースゲルをコートしたMEDプローブに赤外線レーザーを使用して心筋細胞を培養するためのAMCを2列作製し、心筋細胞を播種した。心筋細胞がチャンバー内に接着したことを確認して洗浄を行った。さらに、2列の心筋細胞集団の中央に線維芽細胞用のAMCを追加で作製し、線維芽細胞を播種した。心筋細胞ネットワークのみの状態 (Fig. 2A) と2本の心筋細胞集団が独立して拍動している状態 (Fig. 2B)、中央の線維芽細胞が2本の心筋細胞集団と接続し1つの細胞集団として拍動している状態 (Fig. 2C) の細胞外電位測定をそれぞれ行った。Na⁺ピークの時間に着目し、ISI、CV、伝導速度の3つの観点からこれらの細胞集団の機能を評価した。

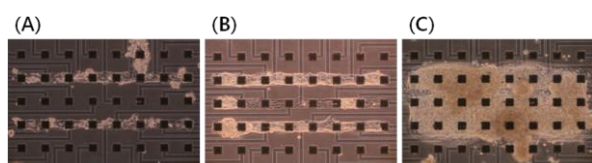


Figure 2 MED プローブ上の擬似心臓モデルの位相差顕微鏡画像

Day2 で2本の心筋細胞ネットワーク (A) を形成し、中央にAMCの追加加工を行い線維芽細胞を播種した。Day3 で2本の心筋細胞ネットワークが独立して自律拍動し中央に線維芽細胞ネットワークが形成 (B)、Day4 で線維芽細胞が増殖し1つの細胞コミュニティとなる様子が観察できた (C)。Scale bar=150 μm

3. 結果と考察

(1) 拍動ペースおよび拍動リズムのゆらぎ

2つのNa⁺ピークの間隔を示すISIはすべてのグループにおいて統計的有意差がみられなかった (Fig. 3A) が、拍動リズムのゆらぎを示すCVは実際の心臓に最も近い構造をとるDay4の細胞集団が最も低く、安定した拍動を示すことが分かった (Fig. 3B)。ゆえに線維芽細胞には心筋細胞の安定した拍動に何らかの影響を与えていることが示唆された。

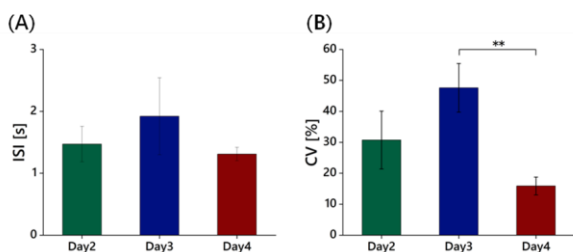


Figure 3 細胞コミュニティの状態とISI、CVの比較 (A) ISIの比較。すべてのグループにおいて統計的有意差は認められなかった。

(B) CVの比較。Day3で拍動の安定性が乱れ、Day4で最も安定した拍動を示した。**p<0.005

(2) 伝導速度

さらに、Day3とDay4の細胞集団の伝導速度を比較したところDay4の細胞集団の伝導速度の方が大きいことが分かった (Fig. 4A)。またDay4の細胞集団についてさらに詳しく評価し、細胞種と伝搬方向の観点で調べたところ、ペースメーカー細胞を含む心筋細胞集団の伝導速度は線維芽細胞集団および追従する心筋細胞集団に比べて速かった。また、縦方向の伝搬 (心筋細胞集団から線維芽細胞集団への伝導) は横方向 (同じ種類の細胞同士の伝導) よりも伝導速度が遅かった (Fig. 4B)。これらの結果から、電気信号は細胞の長軸方向に沿って最も効率よく伝搬すると考えられる。

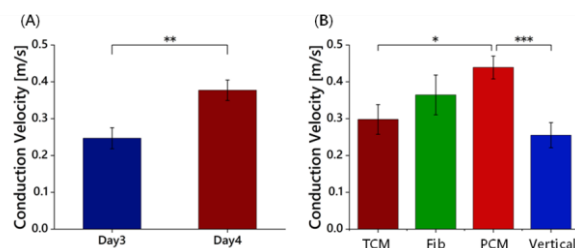


Figure 4 細胞コミュニティの状態および細胞タイプ、伝導方向と伝導速度の関係

(A) 2本の心筋細胞ネットワークが独立して拍動しているモデル (Day3) と擬似心臓モデル (Day4) の比較。

**p<0.005

(B) 擬似心臓モデルにおける詳しい伝導速度解析。ペースメーカー側の心筋細胞エリア (PCM)、線維芽細胞エリア (Fib)、追従する側の心筋細胞エリア (TCM)、縦方向 (Vertical) の伝導を比較した。*p<0.01, ***p<0.001

4. 結言

本研究により、実際の心臓に最も近い構造をとる細胞集団が最も安定した拍動を示すことが分かった。また、擬似心臓モデルにおける伝導経路およびその伝導速度を調べることで、細胞の長軸方向に沿った経路やペースメーカー領域をもつ心筋細胞ネットワークの経路において伝導速度が速くなることが示唆された。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、丁寧かつ熱心なご指導を賜りました金子智行教授、実験結果の分析方法を中心に細部にわたるご指導をいただいた教務助手の林真人さん、日常の議論を通じて多くの知識や示唆をいただいた金子研究室の皆様へ感謝致します。

参考文献

- 1) F. Torrent-Guasp, *et al.*, *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, **25**, 376 (2004)
- 2) R. H. Anderson, *et al.*, *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, **28**, 517 (2005)
- 3) P. Zhou, *et al.*, *Circ. Res.*, **118**, 368 (2016)