

オンチップ多電極刺激計測系による細胞ネットワークの構成的理解

金子 智行

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所

1. 研究のねらい

本研究の目的は、構成的に構築した心筋細胞集団・細胞ネットワークが環境との相互作用によって獲得、保持、変化、消失する拍動周期情報の機構を解明することにある。これは、心筋細胞によるネットワークの構築、化学、電気刺激に対する細胞ネットワークの応答反応を計測できる装置システム、これらを用いて心筋細胞の拍動の安定性と細胞集団サイズとの関係を計測し、心筋細胞ネットワークの拍動周期を決定する要因を解明するものである。

既存の多電極アレイを用いた電気計測システムでは組織培養や分散培養に最適化されており、1細胞レベルでの測定は困難であるため、1細胞レベルでの測定に最適化した多電極アレイを新規に設計し、細胞ネットワーク中の1細胞の電気計測を可能にする技術を開発する。この技術を独自に開発したアガロース加工技術と組み合わせることにより、細胞集団・ネットワークを1細胞単位で多電極基板上に配置して培養しながら計測する技術、すなわち、細胞ネットワークを基盤にしたオンチップ多電極刺激計測系を開発する。

具体的には、マウスの心臓から単離した心筋細胞を用いて細胞の配置の仕方・細胞数の情報などのプロトコル、細胞レベルの応答、相互作用のダイナミクスを計測することが可能な計測技術、すなわち、心筋細胞ネットワーク中の細胞を1細胞単位で同時に電気計測するための多電極基板を設計し、その上にアガロースマイクロチャンバーを構築し、構成的に構築した細胞集団に対して、化学、電気刺激を与えたときの1細胞ごとの応答反応を計測する技術を開発する。同時に、チップ上に「細胞組織が持つコミュニティ・エフェクトやネットワーク相互作用」機能を持つ最小構成単位となる「細胞集団・ネットワーク」を構成的に構築する技術、すなわち、細胞をマイクロチップ内に3次元に構成的に配置して組織モデルを作製する技術を開発する。このチップ・計測装置のシステムを完成させ、細胞集団ネットワークにおける化学、電気刺激に対する応答反応を細胞ネットワーク中の1細胞単位で計測し、細胞ネットワークが持つ後天的情報保持機構を解明するのが、本研究のねらいである。

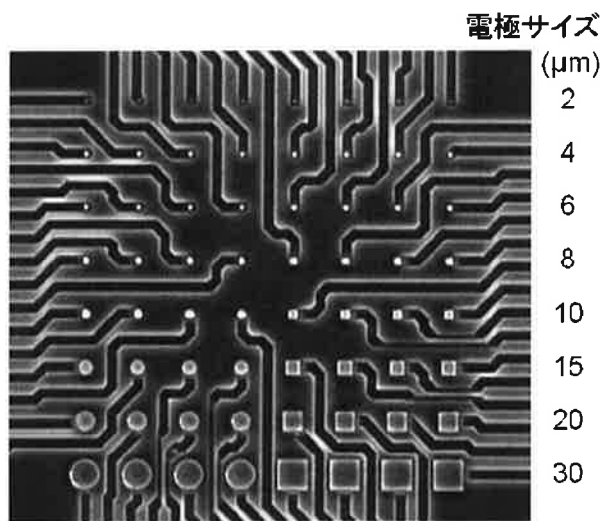


図1 評価用電極基板

2. 研究成果

・心筋細胞ネットワークを1細胞単位で電気計測可能な電極基板の開発と心筋1細胞単位での細胞外電位変化の測定

既存の多電極基板は最も小さい電極でも大きさが20μmであり、マウスの心筋細胞を1細胞単位で計測するには大きすぎる。そこで、多電極基板を設計し直すために、まず電極サイズを2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30μmに設計した評価用電極基板(図1)を

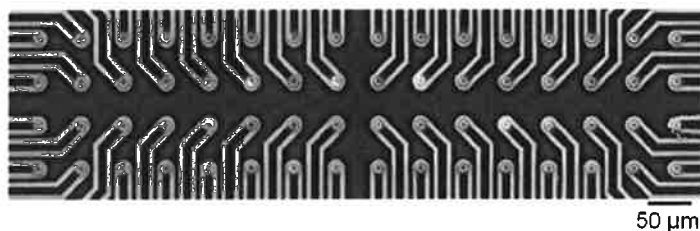


図2 新規に開発した電極基板

作製し、どのサイズの電極サイズまで電気信号が取得できるか測定した。その結果、電極サイズ $10\mu\text{m}$ まで心筋細胞の細胞外電位変化を観察することが可能であることがわかった。そこで、電極サイズを $10\mu\text{m}$ にして電極を直線状に 4 列配置した電極基板(図 2)を作製した。この電極基板上にアガロースマイクロチャンバーを作製(図 3 a)し、心筋 1 細胞を電極上に配置(図 3 b)することにより、1 電極に 1 細胞が対応するように直線状心筋細胞ネットワークを電極基板上に作製(図 3 d)し、それぞれの電極から心筋細胞ネットワーク中の 1 細胞の細胞外電位変化を測定することに成功した。

・1 細胞単位での細胞外電位変化伝播の遅延時間と既存技術のパッチクランプによる活動電位伝播の遅延時間の比較

新規に開発した電極サイズ $10\mu\text{m}$ の電極基板を用いて、心筋細胞ネットワーク中の 1 細胞の細胞外電位変化を測定した。直線状に配置した心筋細胞ネットワーク中の隣り合う心筋細胞の細胞外電位変化を測定(図 4)することにより、細胞外電位変化が伝播する時間を測定し、その電極間の距離から伝導速度を導き出した。その結果、電極間の距離 $50\mu\text{m}$ を伝播する時間は約 0.1ms であることから、伝導速度は約 0.5m/s であることがわかった。この伝導速度は分散培養で測定されている伝導速度よりも速く、心臓臓器で測定されている伝導速度よりも少し遅かった。このことは、心筋細胞ネットワークは分散培養のように電位変化の様々な方向への伝導や、線維芽細胞のような異種細胞の影響等を受けて遅延するようなことは無いが、心臓臓器のように一定方向に整然と伝導する仕組みにはなっていないことを示唆している。しかし、この伝導速度は心筋細胞間の接触状態により変化することが予想されるので、心筋細胞間の相互作用を改善することにより、

心臓臓器と同等の伝導速度になるネットワークを作製することは可能である。また、多電極基板による細胞外電位の測定と比較するために、既に技術が確立しているパッチクランプによる活動電位の測定を行った。アガロースマイクロチャンバーを用いて心筋細胞を 2 細胞配置して細い通路によって接触し拍動が同期した心筋 2 細胞に対してダブルパッチクランプを行った(図 5)。その結果、パッチ間の距離 $60\mu\text{m}$ を伝播する時間は約 0.06ms であることから、伝導速度は約 1m/s で

(a) MEA with AMC



(b) Cardiomyocytes on MEA



(c) 1 DIV cardiomyocytes



(d) 2 DIV cardiomyocyte network



100 μm

図 3 電極基板上での心筋細胞ネットワークの形成 (a)多電極基板上にアガロースマイクロチャンバーを作製、(b)電極上にマウス心臓から単離した心筋細胞を配置、(c)培養後 1 日目、心筋細胞が成長し隣接する心筋細胞と接触、(d)培養後 2 日目に形成された心筋細胞ネットワーク

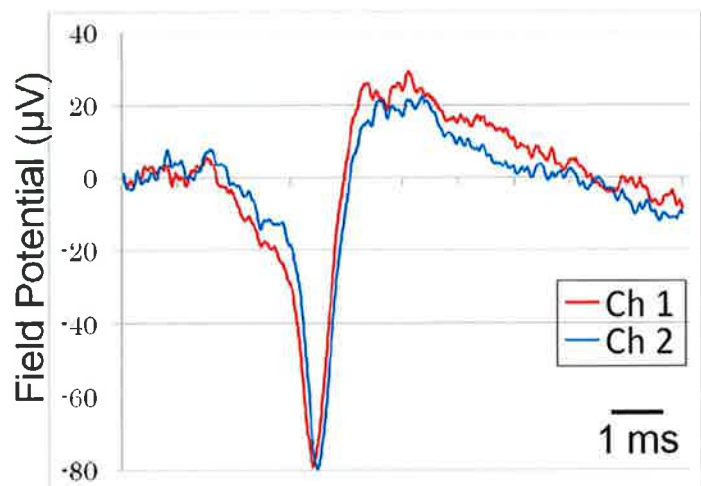


図 4 心筋細胞ネットワーク中の隣接する心筋 2 細胞の細胞外電位変化

あることがわかった。この伝導速度は心臓臓器で測定されている伝導速度とほぼ等しかった。このことから、心筋細胞を細い通路でつなげることにより、心臓臓器の心筋細胞と同様に一定方向に整然と伝導する仕組みを作製できる可能性が示唆された。したがって、電極基板を用いて測定した細胞外電位変化の伝導速度とパッチクランプを用いて測定した活動電位の伝導速度は、細胞間の相互作用の影響を考慮すれば、ほぼ同等の測定結果であったと考えられる。

・既存の電極基板を用いた薬剤刺激に対する応答反応の測定

新規の多電極基板を用いる前の基礎データとして、既存の多電極基板を用いて心筋細胞集団のネットワークを基板上に作製し、薬剤による化学的な刺激による細胞外電位変化の応答反応を測定した。既存の電極基板上にアガロースマイクロチャンバーを作製し、分散培養することにより心筋細胞と線維芽細胞が混合された細胞ネットワークが作製可能である。しかし、心筋細胞や線維芽細胞の位置を任意

に設定することは不可能であり、ネットワーク内の細胞数、配置ともランダムである。このような細胞集団ネットワークはアガロースマイクロチャンバーを作製することにより、様々な形状を作製することが可能である。そこで、アガロースマイクロチャンバーを環状に作製することにより、環状心筋細胞集団ネットワークを作製した。この環状心筋細胞集団ネットワークの細胞外電位変化を測定すると、ある一定の電極から電位変化が起こっていることがわかった。これはその電極周囲の心筋細胞がペースメーカーとなり、そこから電位変化が始まって周囲に伝播しているものと思われる。この電位変化の伝播は通常、ペースメーカー領域から発生し、環状ネットワークの両側を伝播し、対極の位置で衝突し消滅する。しかし、偶然片側の伝播が止まる（一方向性伝導ブロック）と、対極を越えて電位変化が伝播し、さらに片側の伝播が止まったところも逆方向に伝播すると、電位変化がペースメーカー領域に戻ってくる（リエントリー）現象が起きた。リエントリー現象が起きるとさらに電位変化は伝播し、環状回路上を一定方向に伝播する心臓臓器で起こっている不整脈と同様の現象が観察された。したがって、この様な不整脈と同様の現象を電極基板上に再現し、偶然起こったリエントリー現象を観察することに成功した。また、電極基板上に作製した心筋細胞集団ネットワークに対して、薬剤による応答反応も観察し、カルシウムイオンの流入を遮断する薬剤を加えることにより、カルシウムイオンの流入を示す電気シグナルが減少することも確認した。

・心筋細胞ネットワークに対して外部から電気刺激したときの応答反応の測定

心筋細胞ネットワークに対する電気刺激の応答反応を測定するための基礎データを取得するために、アガロースマイクロチャンバーを用いて心筋細胞ネットワークを作製し、外部から電気刺激することにより、心筋 1 細胞や心筋細胞ネットワークの電気刺激応答反応を顕微鏡観察することにより、電気刺激周波数と拍動周期の同調を測定した。電気刺激の強度を固定し、刺激周波数のみを変化させると、心筋 1 細胞では電気刺激に反応して拍動周期が同調する周波数領域が狭いのに対し、心筋細胞ネットワークでは同調する周波数領域が広いことがわかった。このことは、細胞が集団化することによって刺激周波数に反応する領域の許容範囲が広がったことを示唆しており、この許容範囲の拡大は様々な許容範囲を持つ細胞が接触することによる単なる足し合わせ

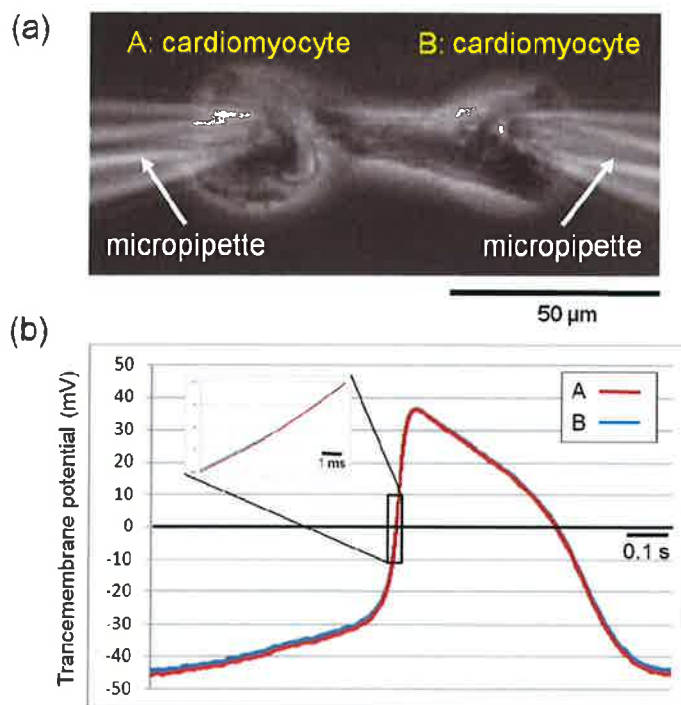


図5 隣接する心筋2細胞に対するダブルパッチクランプ (a)心筋2細胞に対してダブルパッチクランプを行っている際の位相差像、(b)心筋2細胞の活動電位変化の記録

現象なのか、細胞の集団化効果による新たな機能の獲得なのか興味のあるところであり、今後の課題である。

これまでに獲得した基礎データを基に、新規に開発した電極基板上で心筋細胞ネットワークを形成させ、薬剤の応答反応や電気刺激に対する応答反応が測定可能になった。この測定技術を用いて、心筋細胞ネットワークの後天的情報の獲得、保持、消失機構の解明を進めていく。さらに、今後は線維芽細胞などの異種細胞の影響などを測定することにより、より心臓臓器に近い心筋細胞ネットワークの作製も目指していく。将来的には、ヒトの心筋細胞を用いて心筋細胞ネットワークを作製し、薬剤の応答反応を測定可能な薬剤スクリーニングシステムへ発展させることが可能であると考えている。ヒトの心筋細胞は生体から単離することは不可能であるが、ヒトES細胞やiPS細胞から分化させた心筋細胞を用いることにより、ヒト心筋細胞を使用することは可能になってくると考えられる。したがって、ヒトの心筋細胞ネットワークを電極基板上に作製し、薬剤による様々なイオンチャネルへの影響のみならず、電位変化の伝導速度への影響やリエントリ-などの特殊な電位変化の伝播も測定可能な薬剤スクリーニングシステムへの発展が期待できる。

3. 主な発表

論文

・ T. Kaneko, K. Kojima and K. Yasuda, "An on-chip cardiomyocyte cell network assay for stable drug screening regarding community effect of cell network size," *Analyst*, Vol. 132, pp. 892-898 (2007)

・ T. Kaneko, K. Kojima and K. Yasuda, "Dependence of the community effect of cultured cardiomyocytes on the cell network pattern," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 356, pp. 494-498 (2007)

・ K. Kojima, T. Kaneko and K. Yasuda, "Role of the community effect of cardiomyocyte in the entrainment and reestablishment of stable beating rhythms," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 351, pp. 209-215 (2006)

・ T. Kaneko, K. Kojima and K. Yasuda, "Study of community effects of the cardiomyocytes with an agarose microchamber system," In "Frontiers in Life Sciences," Edited by Makoto Fujiwara, Shoichi Ishiura, and Naoki Sato, *Research Signpost*, pp.27-38 (2006)

招待講演

・ 金子智行、小島健介、安田賢二、"心筋細胞の拍動同期とその制御" 第43回日本生物物理学会年会、2005年11月24日

4. 特許

・ 安田賢二、金子智行、鈴木郁郎、寺菌英之、服部明弘、福島守、細胞応答計測装置及び方法、特願2007-111322