

研究課題別評価書

1. 研究課題名

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

2. 氏名

金子 智行

3. 研究のねらい

近年のゲノム科学の進展と、動物実験廃止の流れの中で、セロミクスの潜在的重要性や、動物実験を代替する細胞レベルでの計測システム開発の必要性が非常に強く指摘されつつある。しかし、従来の細胞株を用いた毒性検査などのスクリーニング技術は問題が多く、未だ創薬段階で効果的に利用されてはいない。これを克服、実現するために、これまで微細加工技術を用いてマイクロチップ上に構成的に「1細胞レベル」で細胞ネットワークを構築して計測する技術の開発・原理検討を行ってきた。その中で、細胞集団の空間配置・種類・数などの「ネットワークパターン」の違いによって細胞集団の応答が大きく異なることなど、単純な細胞レベルの1階層上にある「細胞集団・細胞ネットワーク」が持つ協同現象の重要性を示唆してきた。

そこで本研究では、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の解明を通して、細胞集団が持つ集団化効果(コミュニティ・エフェクト)を明らかにし、細胞ネットワークを基盤としたオンチップドラッグスクリーニング技術への発展を目指した。具体的には、アガロースマイクロチャンバーによるネットワークの構築技術の改良と、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システムの開発、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。さらに、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し、心筋細胞ネットワークのコミュニティ・エフェクトを解明するのがねらいである。

4. 研究成果

(1)心筋細胞ネットワークの空間配置や細胞数による拍動の安定性と電気刺激による応答の測定

心筋細胞のネットワークパターンと細胞数による拍動の安定性を測定するために、環状ネットワークと直線状ネットワークによる拍動周期の安定性をネットワーク中の細胞数を変化させて測定した。その結果、環状、直線状共にネットワークを構成する細胞数の増加に伴って拍動周期が安定することがわかった。しかし、細胞数が10細胞を超えると逆に拍動周期が不安定になる傾向がでてきたので、さらに60細胞の直線状ネットワークを作製(図 1)し、測定を行ったが、拍動周期の不安定化は起きなかった。このことから、直線状ネットワークでは伝導遅延やヒステリシスによるゆらぎの増加は見られないことがわかった。また、格子状の9細胞ネットワークの細胞間に線維芽細胞を配置した場合においても、心筋細胞同士は

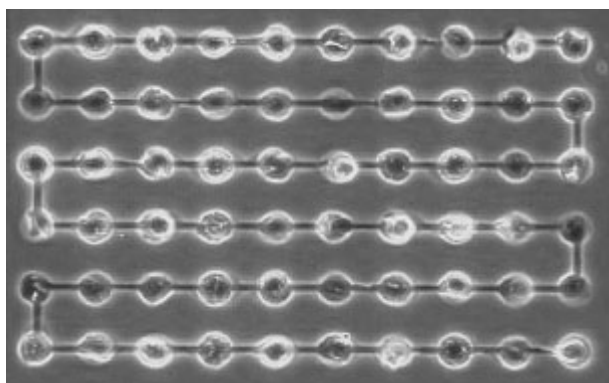


図1 心筋60細胞の直線状ネットワーク

同期して拍動し、拍動周期の安定性は維持された。

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について測定した。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1細胞に比べて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現象では説明のできない、細胞の集団化効果(コミュニティ・エフェクト)による新たな機能の獲得を示唆するものである。

(2)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20 μm 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, 30 μm に設計した評価用電極基板(図2)を作製し、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 μm までは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 μm にして電極を直線状に4列配置した電極基板を作製した。この電極基板上の内側の2列にアガロースマイクロチャンバーを作製(図3a)し、心筋1細胞を電極上に配置(図3b)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3d)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。さらに、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 μm を伝播する時間は心筋細胞間の接触状態により変化するが、平均約0.07msであ

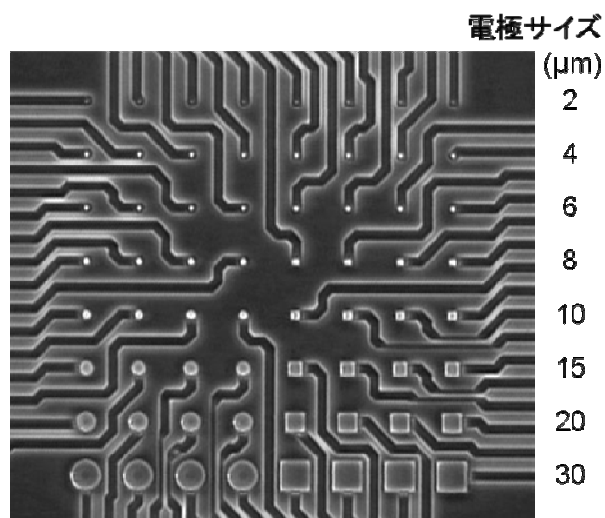


図2 評価用電極基板

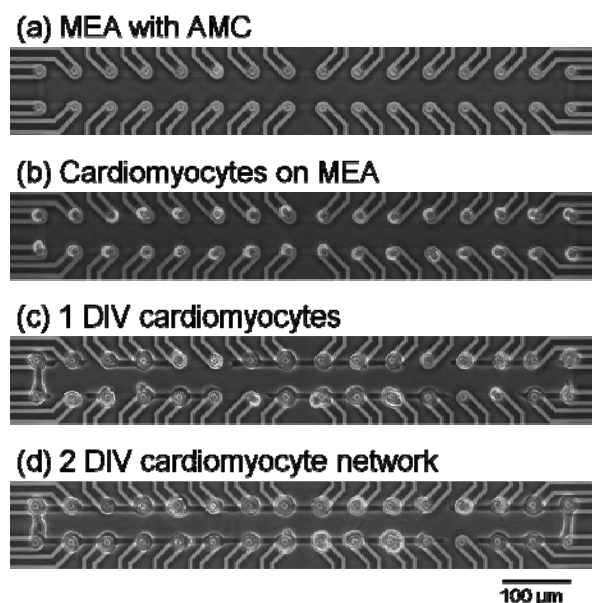


図3 電極基板上での心筋細胞ネットワークの形成 (a)多電極基板上にアガロースマイクロチャンバーを作製、(b)電極上にマウス心臓から単離した心筋細胞を配置、(c)培養後1日目、心筋細胞が成長し隣接する心筋細胞と接触、(d)培養後2日目に形成された心筋細胞ネットワーク

ることから、伝導速度は約 0.7m/s であることがわかった。この伝導速度と比較するために、既に技術が確立されているパッチクランプ法により、心筋2細胞間の活動電位の伝導遅延を測定した。アガロースマイクロチャンバーを用いて心筋2細胞を配置して細い通路によって接触させ、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 μ m を活動電位が伝播する時間は平均約 0.06ms であることから、伝導速度は約 1m/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とほぼ等しかった。これらのことから、多電極電気計測系による細胞外電位の測定結果は、既存のパッチクランプ法による活動電位の測定による結果とほぼ同等であるといえる。この結果から、分散培養では不可能であった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が作製でき、多電極電気計測系により培養しながら細胞外電位変化を長時間測定できるシステムの可能性が示された。

(3) 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以外の線維芽細胞なども含まれる心筋細胞集団の環状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集団ネットワークが作製可能である。しかし、この細胞集団ネットワークは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、接触状態とも制御されていないが、アガロースマイクロチャンバーを用いることにより、様々なネットワークパターンに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、細胞外電位変化を長時間測定した。その結果、ある一定の電極から電位変化が起こっていることがわ

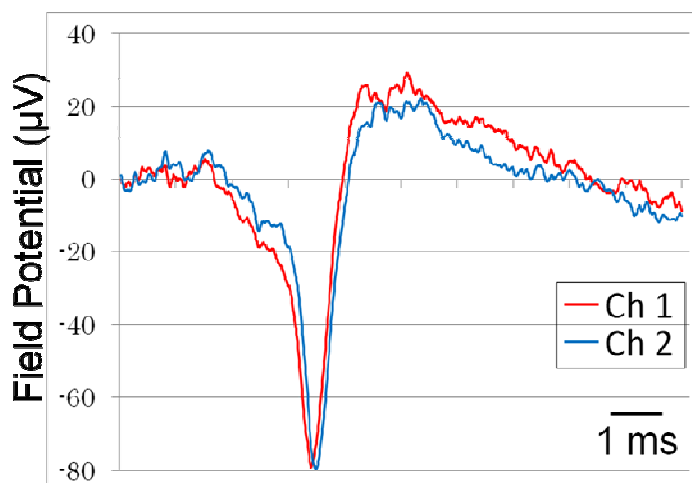


図4 心筋細胞ネットワーク中の隣接する心筋 2 細胞の細胞外電位変化

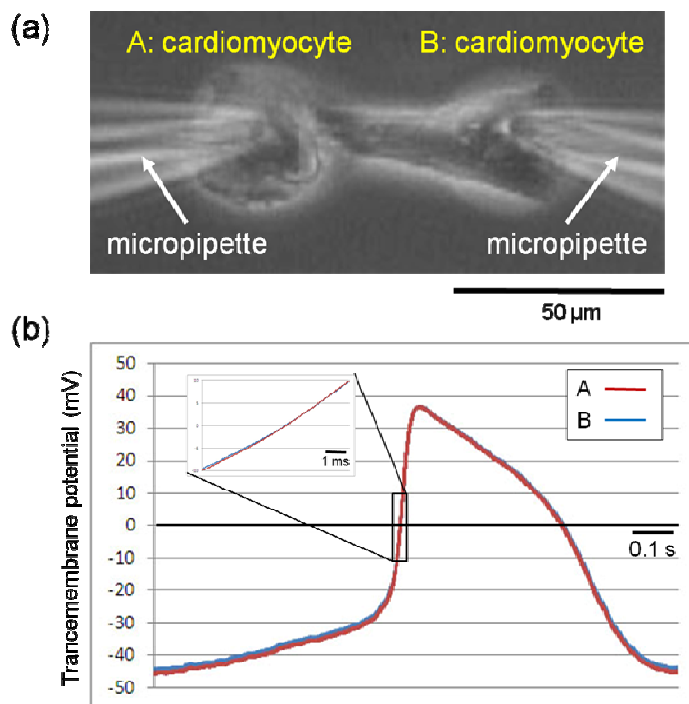


図5 隣接する心筋 2 細胞に対するダブルパッチクランプ (a)心筋 2 細胞に対してダブルパッチクランプを行っている際の位相差像、(b)心筋 2 細胞の活動電位変化の記録

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が起きると)、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。この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。

5. 自己評価

本研究課題はオンチップ多電極刺激計測系を用いた心筋細胞ネットワークの拍動周期情報の機構等の構成的理解であった。まず、そのために心筋細胞ネットワーク内の1細胞の電気信号の変化を測定するための電極基板の設計を行い、当初の目的通り1細胞単位の細胞外電位変化を測定可能な基板の作製に成功した。さらに、細胞ネットワーク内の細胞外電位変化の伝導速度の計測を既存技術であるパッチクランプと比較することにより、同等の結果を得ることができた。これにより、パッチクランプでは不可能であった長期間の測定を可能にした。しかし、今回開発した電極基板はすべての電極で安定して電気信号が取得できるわけではないので、さらなる改良が必要である。また、当初、既存のオンチップ電気刺激計測系を用いて、電気計測と同時に電気刺激する予定であったが、装置のスペック上不可能であることがわかり、刺激実験を外部から導入する必要性が出てきた。オンチップ電気計測系への外部からの電気刺激系の導入はノイズの増大や刺激時の波形記録の困難さから実現不可能であったが、今後装置の改良等により電気刺激時の同時計測に挑戦していきたいと考えている。このため電気刺激の実験は電気計測系を用いずに顕微鏡観察のみで拍動周期の変化を測定し、1細胞と細胞ネットワークの刺激周波数に対する応答反応から、新たな細胞のコミュニティ・エフェクトを観察することに成功した。さらに、既存の電極基板上に配置した環状ネットワークを用いて、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。今後、本研究課題で開発した新規の電極基板を改良し、心筋細胞ネットワークの電位変化を1細胞単位で計測することにより、細胞ネットワークを用いたオンチップドラッグスクリーニングへの応用に向けて、1細胞単位の詳細なデータを取得するための基盤技術となり、ドラッグスクリーニングの標準技術として発展していくことが期待できる。

6. 研究総括の見解

アガロースマイクロチェンバーネットワークを構築し、心筋細胞の拍動周期や安定性の解析システムを確立した。そして、多電極刺激系計測との組み合わせによって、細胞間コミュニケーションによるコミュニティ効果を明らかにするなど、細胞ネットワークシステムの動態解析への途を開いたことは極めて優れた成果と言えよう。この基礎研究の更なる深化を望む一方、その上にたつて薬剤スクリーニングなどへの応用も試みてはいるが実用化されることを期待したい。

7. 主な論文等

(A) さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

(1) 論文(原著論文)発表

論文(国際)

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

・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)

(2)特許出願 なし

(3)著書

・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)

(4)学会発表

学会発表(国際)

・Tomoyuki Kaneko, Kensuke Kojima, Ikuro Suzuki, Yoshihiro Sugio, and Kenji Yasuda, "Individual-cell-based measurement of the field potential in a cardiomyocyte by multi-electrode array with agarose microchambers," Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2006

・Tomoyuki Kaneko, Kensuke Kojima, Ikuro Suzuki, Yoshihiro Sugio, and Kenji Yasuda, "Measurement of the field potential in individual cardiomyocytes by multi-electrode array with agarose microchambers," 46th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2006

・Tomoyuki Kaneko, Ikuro Suzuki, Kentaro Ando, Fumimasa Nomura, Tetsuo Kitamura, Jyunko Hayashi and Kenji Yasuda, "Delay Time of the Action Potential in Two Cardiomyocytes Connected by Fibroblasts," 47th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2007

・Tomoyuki Kaneko, Fumimasa Nomura, Yuki Tomoe, Ikuro Suzuki, Jyunko Hayashi and Kenji Yasuda, "Single-Cell Level Measurement of Conduction Velocity in Cardiomyocytes Network," 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2008

学会発表(国内)

・金子智行、野村典正、巴悠記、鈴木郁郎、林純子、安田賢二、“細胞ネットワークモデルのための一細胞レベルでの心筋細胞伝導速度の測定”、第46回日本生物物理学会年会、2008

(5)招待講演

招待講演(国内)

・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

(B)その他の主な成果

(1)特許出願

・発明者:安田賢二、金子智行、鈴木郁郎、寺藺英之、服部明弘、福島守

発明の名称:細胞応答計測装置及び方法

出願人:東京医科歯科大学

出願日:2007.4.20

出願番号:特願 2007-111322

・発明者:安田賢二、杉山篤、安東賢太郎、野村典正、寺藺英之、金子智行、福島守

発明の名称:心臓リエントリーモデルチップおよび心臓リエントリーモデルチップによる薬剤の評価装置および方法

出願人:東京医科歯科大学、三菱化学安全科学研究所

出願日:2007.6.8

出願番号:特願 2007-152692

・発明者:安田賢二、杉山篤、安東賢太郎、野村典正、寺藺英之、金子智行、福島守

発明の名称:モデル細胞による薬効評価装置

出願人:東京医科歯科大学、三菱化学安全科学研究所

出願日:2007.6.8

出願番号:特願 2007-152696

・発明者:安田賢二、杉山篤、安東賢太郎、野村典正、寺藺英之、金子智行、福島守

発明の名称:心筋毒性検査装置、心筋毒性検査チップおよび心筋毒性検査方法

出願人:東京医科歯科大学、三菱化学安全科学研究所

出願日:2007.6.8

出願番号:特願 2007-152711