

論文内容の要旨

Analysis of the Cell Community Effect of Cardiomyocytes using an On-chip Single-cell-based Culture System

(オンチップ1細胞培養法による心筋細胞をモデルとした細胞集団化効果の解析)

小島 健介

1. 背景と目的

生命における基本的構成単位である細胞は、それぞれ同一の先天的情報、すなわちゲノム情報を有するが、細胞集団を形成することによって、1細胞状態では起こり得ない集団依存的な機能を有するようになり、より複雑な組織、器官としての機能を発揮して行く。例えば、神経細胞は適切な細胞ネットワークを形成することで、記憶、学習の様な後天的な特性を発揮するように成る。また、心臓は主に心筋細胞と繊維芽細胞から成るが、心臓の安定した拍動リズムを産み出すペースメーカー領域である洞房結節は、解剖学的特徴として心筋細胞のみから形成される細胞集団を持っていることが知られている。これら、実際の組織における例の様に、細胞が集団化することによる効果が単なる細胞レベルから組織レベルへの機能的移行を実現させていると考えられる。現在までに、生命の最小構成単位である個々の細胞が、最低限、どの程度の集団を形成すれば、1細胞では見られない機能を発揮するようになるのか、つまり組織レベルの機能を示す細胞集団に成り得るのかと言う、細胞集団化効果に関する知見はほとんど未知である。集団化効果の解明によって、培養チップ上に最小サイズの脳モデルや心臓モデル等の組織モデルを、培養細胞を用いて再構築することが可能になると考えられる。そこで本研究では、細胞集団化効果の理解を目的として、1細胞レベルで構成的に細胞ネットワークを構築することが可能な培養法を新たに開発し、これを用いて1細胞を基本単位として構成的に細胞集団を再構築し、その細胞集団の特性を評価・解析することで、集団化効果の理解を目指した。

2. 構成的1細胞培養法の開発^{(1), (2)}

近年、様々な細胞パターンニング技術が開発され、細胞培養チップ上に組織モデルを作製する研究が盛んに行われている。しかし従来のパターンニング技術では、大雑把な制御しかできなく、構成的に細胞集団を作製することは困難であった。本研究では、1細胞ベルで細胞の種類、数、空間配置を制御して、構成的に任意の細胞集団を構築することが可能な新しい培養法を開発した。アガロースをガラス基盤上に塗布して薄層を作り、それをレーザーによる局所加熱で溶かしてチャンバを作成した。このチャンバ内にマイクロピペットを用いて心筋細胞

を1細胞ずつ配置し、培養を行った(図1(a)-(e))。その結果、構成的に任意のサイズ、パターンを持った心筋細胞集団を、培養チップ上に再構築することができた(図1(f))。この培養法の開発によって、細胞集団化効果を構成的に理解して行くことが初めて可能となった。

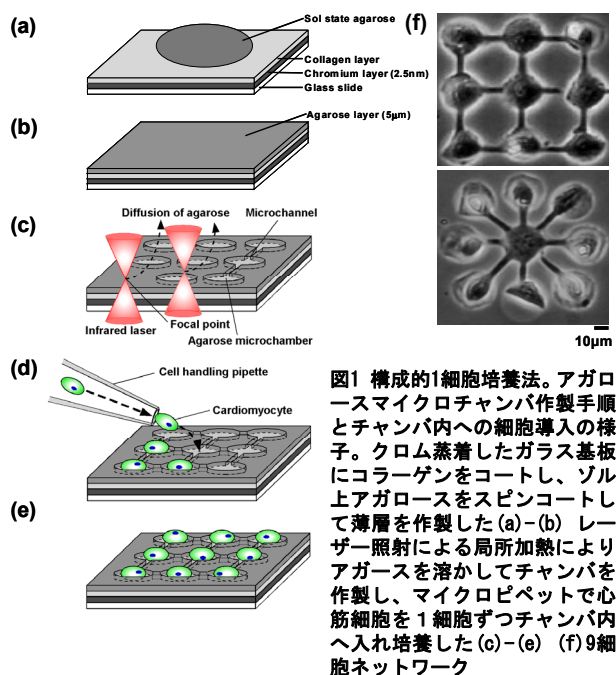


図1 構成的1細胞培養法。アガロースマイクロチャンバ作製手順とチャンバ内への細胞導入の様子。クロム蒸着したガラス基板にコラーゲンをコートし、ソル上アガロースをスピンコートして薄層を作製した(a)-(b) レーザー照射による局所加熱によりアガロースを溶かしてチャンバを作製し、マイクロピペットで心筋細胞を1細胞ずつチャンバ内へ入れ培養した(c)-(e) (f) 9細胞ネットワーク

3. 細胞集団化効果の解析

3-1. 細胞集団化効果による拍動状態の安定化^{(3), (4)}

集団化効果の理解として、まず、独自のリズムで拍動している2個の心筋細胞が相互作用し、2細胞の拍動が同期した時の変化を調べた。その結果、同期後の拍動リズムが、2細胞の内、速い拍動周期を持っていた細胞のリズムにそろう場合と、遅い拍動周期を持っていた細胞にそろう場合、1細胞状態に依存せず新しいリズムになる場合の3パターン

を観察した。すなわち、従来報告されていた、同期後の拍動周期が速い周期を持っていた細胞に揃う傾向は見られなかった。同様に、拍動リズムゆらぎ(CV%)の変化について調べた所、同期後のゆらぎは、2細胞の内、小さいゆらぎを持っていた細胞に等しくなるか、更に小さい値になる場合がほとんどだった。また、1細胞状態、相互作用して2細胞が同期した状態それぞれの拍動周期と拍動ゆらぎを同一座標上にプロットして比較した所、1細胞状態に比べて、2細胞状態のばらつきが小さくなっていることがわかった(図2)。以上より、2細胞における拍動同期現象は、

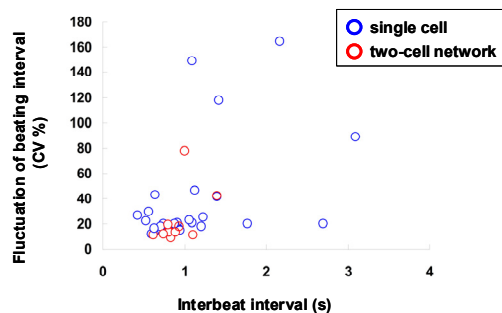


図2 1細胞状態(青)、2細胞状態(赤)での拍動状態

同期前の拍動周期よりも拍動ゆらぎに強く依存する事、また、1細胞状態よりも2細胞状態の方が、拍動リズムゆらぎが安定する傾向にある事が分かった。

次に、心筋細胞が更に集団化した際の、拍動リズムゆらぎの変化を調べるため、9個の孤立状態の心筋細胞が段階的に相互作用して拍動同期して行き、すべての細胞が同期するまでの過程を連続計測した。その結果、細胞数に依存して、拍動リズムゆらぎが段階的に減少し、最終的に10%程度のゆらぎになって安定化した(図3)。

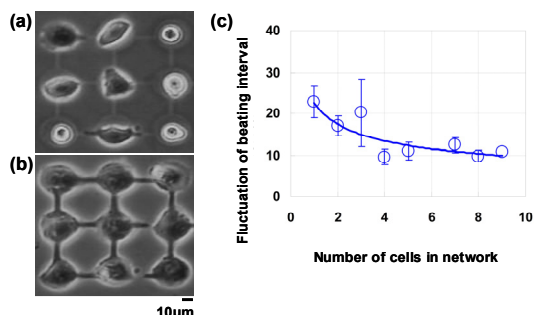


図3 (a) 孤立状態の9個の心筋細胞 (b) 9細胞ネットワーク (c) 拍動ゆらぎと細胞集団数の関係

この事から、心筋細胞は、集団化効果によって、拍動リズムゆらぎが減少し、安定状態になることが分かった。同様に、ネットワークパターンを変えて、細胞数に関するゆらぎ変化を解析した所、ゆらぎの細胞数増加に対する減少の程度は、何れのパターンでもほぼ変わらなかった。よって、心筋細胞はネットワークパターンには依存せず、細胞数を増やすことで拍動状態を安定化させる傾向がある事がわかった。

3-2. 細胞集団化効果による引き込み作用の獲得⁽⁵⁾

心臓組織における引き込み現象に見られる安定したダイナミクスと集団化効果の関係を調べるため、細胞集団と1細胞の相互作用による拍動周期と拍動ゆらぎ変化の解析を行った。

まず、1細胞が相互作用して行き、最終的に9細胞になる過程で観察された、3細胞集団と1細胞(図4(a))、4細胞集団と1細胞(図4(b))、8細胞集団と1細胞(図4(c))の同期現象を調べた。その結果、細胞集団サイズが大きくなるに従って、1細胞の同期後の拍動周期、拍動ゆらぎが共に、細胞集団に揃う傾向が強くなる事がわかった。

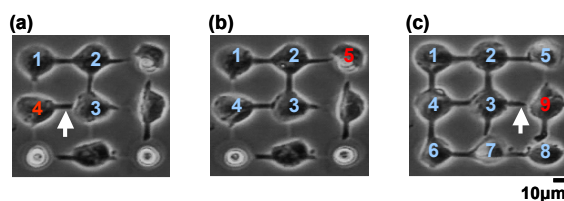


図4 (a) 細胞1, 2, 3から成る3細胞集団と4の1細胞との相互作用 (b) 4細胞集団(1, 2, 3, 4)と1細胞(5)との相互作用 (c) 8細胞集団(1-8)と1細胞(9)との相互作用

次に、異種細胞間相互作用として、心筋細胞同様に心臓の主要構成要素である繊維芽細胞との相互作用による同期過程を調べた。繊維芽細胞を介した心筋1細胞同士の相互作用では、繊維芽細胞の影響による拍動の不安定化が観察されたが、9細胞集団と1細胞での繊維芽細胞を介した相互作用(図5(a)-(b))の場合、拍動周期、

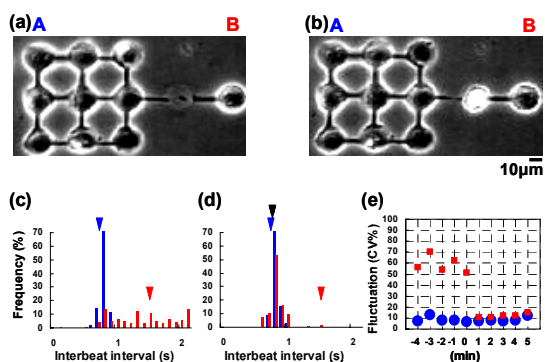


図5 (a) 9細胞ネットワーク(A)と1細胞(B) (b) 繊維芽細胞を介したAとBの相互作用 (c)-(d) A(青)とB(赤)の同期前、後の拍動分布。青、赤の三角印はそれぞれA、Bの平均拍動周期、黒三角は同期後の平均周期を示している (e) 同期前後のゆらぎ変化。青、赤はそれぞれA、Bの1分間毎の平均ゆらぎを示している

拍動周期、

拍動ゆらぎが不安定な1細胞が安定状態の9細胞集団に同調し、同期後の状態は同期前の細胞集団が持っていた状態に等しくなる傾向があり(図5(c)-(e))、繊維芽細胞による拍動不安定化は観察されなかった。これらの結果より、心筋細胞は、集団化効果によって、引き込み現象を起こす安定性を獲得することが示唆された。

3-3. 細胞集団化効果による薬剤投与による摂動からの回復

細胞集団化効果による安定性を更に評価するために、心筋細胞集団に薬剤を投与して刺激を与え、これを培地交換によって除去する過程における、拍動状態の回復程度の細胞集団サイズ依存性を調べた。まず、4細胞集団で薬剤刺激-除去過程での拍動状態の変化を調べた所、刺激前の状態には戻り難く、刺激前と除去後では拍動状態が大きく異なることがわかった。次に、9細胞集団で調べた所、薬剤除去後の拍動状態が、刺激前に近い状態まで回復する傾向が観察された。そこで、再度、刺激-除去を繰り返した所、同様に、除去後の拍動状態は1回目の刺激を与える前の状態に近い傾向を示した。以上の4細胞集団、9細胞集団の薬剤応答における比較から、集団サイズの増加、すなわち集団化効果によって、外部から与えられた摂動に対しても元の状態に回復できる安定性を獲得すると考えられる。

4. 結論

以上、心筋細胞をモデルとして、構成的にネットワークを構築することで、細胞集団化効果の実験的検証が可能な新しい培養法を開発することに成功した。この方法を用いて、心筋細胞に対する集団化効果の解析を行った所、以下の3つの結果を得ることができた。(1)心筋2細胞の拍動同期過程を解析した所、同期後の拍動状態は、拍動ゆらぎの小さい細胞に揃うか、更にゆらぎが小さくなる傾向が見られた。更に細胞集団サイズを増加させた所、段階的にゆらぎが小さくなり、9細胞から成る細胞集団で、およそ10%程度のゆらぎに成り拍動状態が安定化する傾向を示した。すなわち、集団化効果による安定化として、拍動ゆらぎの減少が示唆された。(2)心筋細胞集団と心筋1細胞を相互作用させ、その同期過程を解析した所、細胞集団の拍動状態は変化することなく、1細胞の方が集団の状態に揃う傾向が見られ、細胞集団サイズの増加によってこの傾向は更に強くなることがわかった。すなわち、集団化効果による安定化として、引き込み現象が示唆された。(3)4細胞、9細胞から成る心筋細胞集団に対して、薬剤投与による摂動状態からの回復過程を解析した所、4細胞集団に比べると9細胞集団の方が刺激後、薬剤投与前の拍動状態に近い状態にまで回復する傾向が大きいことがわかった。すなわち、集団化効果による安定化として、摂動状態から元の状態へと回復する、安定状態の保持の傾向が示唆された。

以上のように、心臓組織が示す、安定した拍動状態、引き込み現象、交感、副交感神経刺激での心拍数増加、減少における、刺激停止後の元の心拍数への回復に見られる安定状態の保持といった、3つの安定化作用が、9細胞程度から成る細胞集団でも集団化効果によって獲得されるこ

とがわかった。これより、この細胞集団が、培養チップ上に再構築可能な最小サイズの心臓モデルと成り得る可能性が示唆された。

参考文献

- (1). Kojima, *et al. Jpn. J. Appl. Phys.* 2003.42. L980-982.
- (2). Kojima, *et al. Lab Chip.* 2003. 3(4):292-6
- (3). Kojima, *et al. J. Nanobiotechnology.* 2004. 2(1):9
- (4). Kojima, *et al. J. Nanobiotechnology.* 2005. 3:4
- (5). Kojima, *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. 351, 209-215