

培養心筋細胞の電気活動と Ca ダイナミクスの観測

56774 尾崎 友彦

指導教員 佐久間 一郎 教授

To investigate the mechanism of cardiac arrhythmia, we tried simultaneous recording of intracellular Ca^{2+} dynamics and spontaneous electrical activity in rat cardiomyocytes cultured on microelectrode arrays (MEAs) with 64 embedded electrodes. The MEA method is one of the promising tools to visualize network activity-patterns. To record intracellular Ca^{2+} dynamics, we used fluo-4 as the indicator, and synchronized electrical activity and Ca^{2+} transients were observed, which suggested strong relationship between electrical activity and intracellular calcium dynamics. Then we tried to apply electric stimulation and study the effects of stimuli on cultured cardiomyocytes.

Key words : Microelectrode arrays, intracellular calcium, cultured cardiomyocyte

1. 緒言

心臓は、心筋細胞の同期拍動とそのタイミングの微妙な制御により、ポンプ機能を実現している。この制御機構の障害により発生するのが不整脈現象である。現在、細胞レベルでその詳細な発生メカニズムの解明、効果的な治療法の確立に向けて研究が進められている状況にある[1-2]。そこで電気刺激や薬物投与などにより、集散的に培養された心筋細胞がどのような挙動を見せるか、視覚的・電気的に捉えることは心筋細胞のメカニズム解明のための一助として有効な手段であると考えられる[3-6]。そこで本研究では、微小電極アレイ基板上で培養した心筋細胞系を利用したアプローチを行う。電極アレイ基板(Fig.1)はマイクロ電極を多数集積化した細胞培養基板であり、非侵襲的に高い時間・空間分解能で電気活動計測や多点電気刺激を行えることが特徴である[7-8]。薬物投与等の手段によりこの系に不整脈現象を誘導し、これに時空間的に制御した電気刺激パターンを適用してその伝播を阻止する可能性について検討する。本研究ではその初期段階として、画像取得・電気信号計測・電気刺激を同時に可能とする実験系を構築し、ラット胎児から採取した心筋細胞を微小電極アレイ基板上で培養し、拍動と電気活動の同時観測、Ca 動態と活動電位発生の同時観測、電気刺激の印加を行ったので、その結果を報告する。

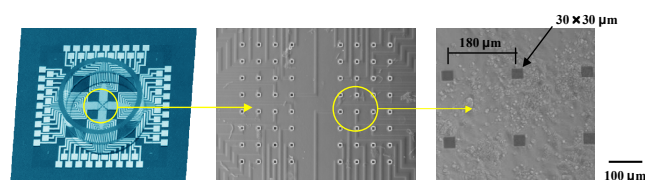


Fig.1 Microelectrode array

2. 実験

2.1 細胞培養方法

本研究では、2~3日齢の Wistar Rat 新生児をハサミにて開胸し心臓を摘出した後、その心室部分のみを使用した。切り出された心室を小切片にし、Trypsin を溶かした Hanks' Balanced Salt Solution に一晩 (16~20 時間) 浸した。その後 Trypsin-Inhibitor を加え、タンパク質分解酵素 Collagenase にて処理を行い、細胞を単離した。単離した細胞は微小電極アレイ基板上に播種し、培養を行った。微小電極アレイは、 $30 \times 30 \mu\text{m}$ の記録電極が 64 個、中心間隔 $180 \mu\text{m}$ 、 8×8 のアレイ状に並べられているものを使用した。この基板上で、 37°C 、水蒸気飽和、 $\text{CO}_2 5\%$ で培養を行った。培養液には M199 培地に 10%FBS を加えたものを使用し、1 週間に 3 度、全量交換した。

2.2 測定方法

Incubator 内 (37°C 、水蒸気飽和、 $\text{CO}_2 5\%$) で培養された心筋細胞は 3 日程経過した時点で同期拍動を確認できる状態となる。そのため、測定には 3DIV (Days *in vitro*) 以上経過した試

料を用いた。測定系は細胞内 Ca 濃度記録装置と細胞外電位記録装置により構成されている。電気信号は微小電極アレイ基板の 64 点の各電極より観測された帯域 100~5000Hz の信号を、増幅器を経由させた後、分解能 12bit, サンプルング周波数 25kHz で A/D 変換し PC に取り込んだ。データは LabView(National Instruments 社)を用いて計測した。Ca 濃度記録の際には、培養液を除去し 20 分間 fluo-4AM (10 μ g/ml) を含む 1mM Mg⁺⁺溶液中に置いて染色した後、fluo-4AM を含まない培養液と交換した。試料は倒立顕微鏡ステージ上に設置し、励起光源 (水銀ランプ) の光を G 励起のダイクロイックミラーを通し照射する。励起光は約 490nm である。以上の測定システムによって観測された fluo-4 による蛍光は冷却 CCD (浜松ホトニクス、C8800-21C) を用いて、連続した画像として記録した。本実験では画像の解像度 250×250pixel または 500×500pixel, 25frame/s, と設定し画像を取得した。

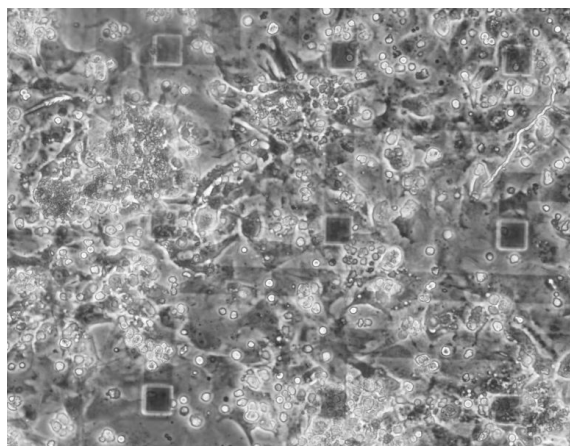


Fig.2 Cultured cardiomyocytes on the microelectrode array at 6DIV

3. 実験結果及び考察

3.1 拍動と電気活動の同時観測

培養心筋細胞のCa動態を観測する前段階として、励起光源を用いずに冷却CCDで撮影を行い、同時に電気活動を測定した。培養開始6DIVにおける微小電極アレイ基板上の培養心筋細胞をFig.2に示す。30×30 μ m の記録電極上で心筋細胞が成長し、既にこの時点で同期拍動を始めており、その一部を拡大したものである。また、

同試料の自発的電気活動を計測した結果をFig.3に示す。顕著な電気活動が観測された5chを選択し、それぞれのチャンネルで測定された電気信号のうち最もスパイクが大きかったものを拡大して表示している。インターバルは不定期なものながら拍動に合わせてスパイクが観測されている事が分かる。1回のスパイクに関し、およそ4msで終了する。

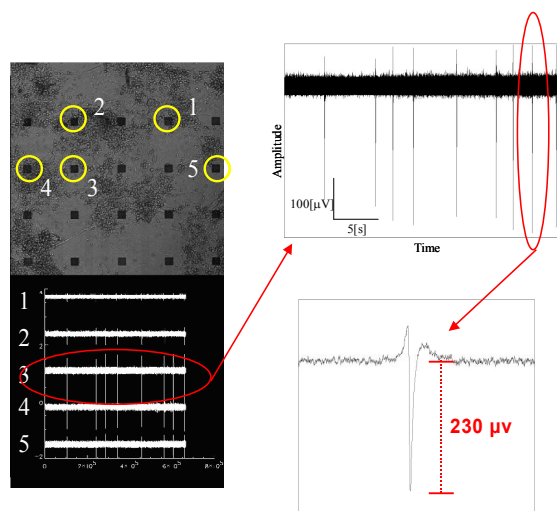


Fig.3 Spontaneous activity of cultured cardiomyocytes at 6DIV

以上の結果より、心筋細胞の収縮のタイミングと電気活動のスパイクが同期している事が確認できた。心筋細胞に活動電位が発生するとカルシウムチャンネルが開口し、Caが細胞内に流入するという順序であるが、それを確認するためには時間分解能をより向上させる必要がある。

3.2 Caダイナミクスと電気活動の同時観測
培養開始3DIV, 9DIVにおける微小電極アレイ基板上の培養心筋細胞について、顕著なCa濃度上昇(Ca Transients)が観測された。これにより、細胞内へのCa流入による蛍光が高速で伝播していく様子が視覚的に確認できた。安静時とCa濃度上昇時を連続的に並べ比較した画像をFig.4に示す。3DIVの試料は部分的に独立した拍動が観測されたが同期拍動も観測された。5DIV、9DIVの細胞はほぼ全ての細胞が同期拍動を行っており、Ca濃度上昇による蛍光はこの同期拍動の心筋収縮のタイミングに伴って観測された。

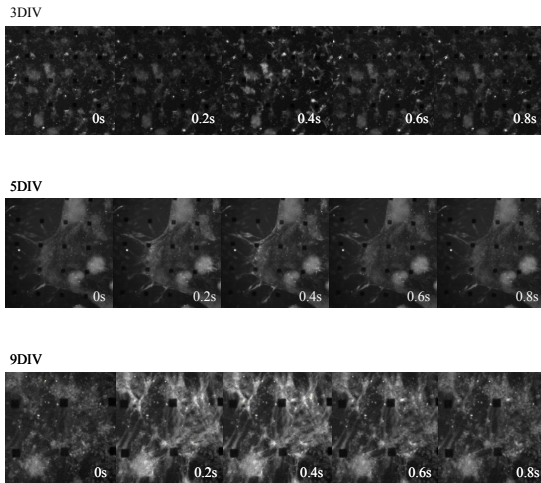


Fig.4 Ca transients of cultured cardiomyocytes

3DIV の試料では、同期拍動が始まったばかりの状態にて測定を行った。そのため、取得した画像内の全ての部位が同期する場合と、蛍光がわずかなタイムラグを挟んで伝播していく場合が観察できた。まだ心筋細胞ネットワークが構築の中途段階であると考えられるが、その伝播速度は非常に速いものであった。全体が完全に同期している状態ではないため、周囲と異なるリズムで拍動を続ける細胞も随所に見られた。また、9DIV の試料では、観測された部位はほぼ全て同期拍動を行っており、Fig.4 のように蛍光も同期拍動に伴い、3DIV の試料に比べ非常に強く明るく観測された。3DIV の試料に関しては、同時に自発的電気活動を計測した。今回 Ca 濃度による輝度の経時変化を捉えた領域と、その領

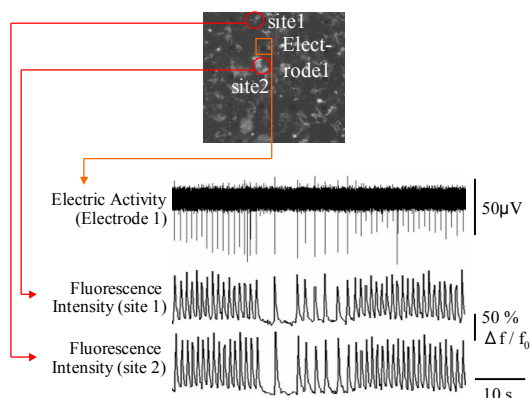


Fig.5 Simultaneous recording of electrical activity and Ca transients of cultured cardiomyocytes at 3DIV

域における輝度変化を、最も顕著にスパイクが観測されたチャンネルにて取得された電気活動のデータと並べた結果を Fig.5 に示す。同時計測は 60 秒間継続して行った。同期拍動に伴ってスパイクが発生しており、更にそれとほぼ同じタイミングで Ca 濃度上昇が観測された。電気活動によるスパイクと Ca の濃度上昇は、同じタイミングで検出されている。

3.3 電気刺激の印加

電気刺激の印加による細胞への影響を探るため、拍動の安定した試料を用いて測定を行った。本研究では 3DIV の試料のうち、拍動が安定しているものを使用した (拍動間隔 300ms 弱)。この試料に対し、どの点で電気刺激による応答が見られるか検証するため、微小電極から 64 点同時刺激を印加した。刺激インターバル: 300ms、刺激電圧: 0.3V にて行った。その波形を fig.6 に示す。測定後、約 180 秒のデータから自発活動によって検出されたスパイクと刺激によるアーティファクトを分離し、拍動間隔 (interspike-interval) の変遷を解析した。その結果を以下の Fig.7(A~G) に示す。

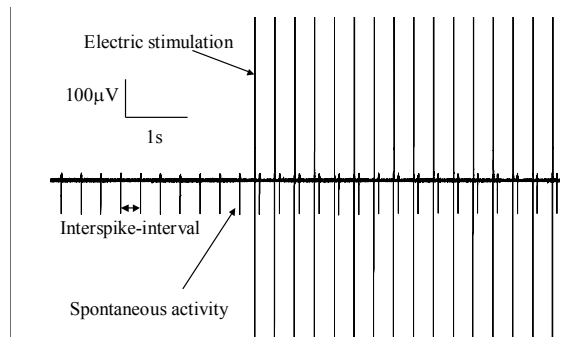


Fig.6 Spontaneous activity and electric stimulation

A を見ると、拍動間隔はまず緩やかに遅くなっていく様子が分かる。電気刺激が始まるとともに拍動間隔は短くなっていきグラフは下降し始める。刺激が終了するとともにグラフの下降は止まり、また拍動間隔は長くなっていくが、その後また短くなり始める。2 回目の刺激が開始されると再び拍動間隔は短くなり始めるが、刺激終了後の自発活動に特に影響は見取れない。3 回目の刺激が開始されたところで拍動間隔は徐々に長くなっていき、そしてまた短くなる。刺激終了後はまた緩やかに変動していく。これ

らの拍動間隔の揺らぎは電気刺激の有無に関係なく観測されたため、電気刺激によって心筋細胞への影響が与えられたとは考えにくい結果となった。

させていくとともに、刺激インターバルを様々に変え、ごく短い間隔(5~10ms 程度)での連続刺激を試行する方法などが考えられる。

4. 結論

本研究で構築された実験系により、培養心筋細胞の電気活動と Ca ダイナミクスに関し汎用的な測定が可能となったことを示した。これに時空間的に制御可能な電気刺激を加えることも可能である。この系を用いた実験より、心筋細胞のメカニズム解明に関し新たな知見を与えることが可能であると考えられる。

文献

- [1] Stephan Rohr, André G. Kléber, and Jan P. Kucera : TCM Vol. 9, No. 7, 173/179, (1999)
- [2] Norbert Klauke, Godfrey L. Smith, y and Jon Cooper : Biophysical Journal Volume 85, 1766/1774, (2003)
- [3] Noriko Inoue, Tomoko Ohkusa, Tomoko Nao, Jong-Kook Lee, Tomo Matsumoto, Yuji Hisamatsu, Takashi Satoh, Masafumi Yano, Kenji Yasui, Itsuo Kodama, Masunori Matsuzaki : Journal of the American College of Cardiology Vol. 44, No. 4, 914/922, (2004)
- [4] Günter Wrobel, Chi-Kong Yeung, Frank Sommerhage, Mansun Chan, Andreas Offenhäusser, Sven Ingebrandt : 5th Int. Meeting on Substrate-Integrated Microelectrodes, 115/116,(2006)
- [5] Igor R. Efimov, Vladimir P. Nikolski, Guy Salama : Circ. Res. 2004;95;21/33,(2004)
- [6] DS Rosenbaum and J Jalife : Future Publishing Company Inc., (2001)
- [7] Frank Sommerhage*, Mathias Schindler, Günter Wrobel, Sven Ingebrandt, Andreas Offenhäusser : 5th Int. Meeting on Substrate-Integrated Microelectrodes, 113/114,(2006)
- [8] H. Lohmann, A. Bussek, M. Meier, M. Schmidt, E. Wettwer, U. Ravens : 5th Int. Meeting on Substrate-Integrated Microelectrodes, 111/112,(2006)

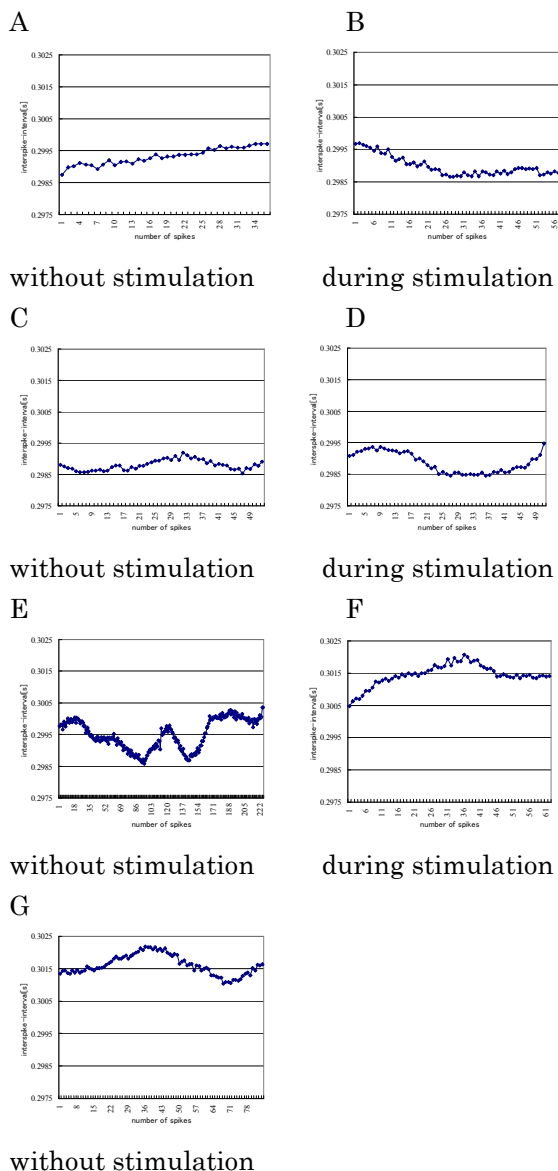


Fig.7 Relationship between interspike-interval and number of beats

64 電極による同時刺激では、明らかな拍動間隔の傾向の変化は観察できなかった。しかし、顕著に電気刺激が観測された電極においても電気刺激を行ったため、刺激電圧は細胞に問題なくかかっていると考えられるので、刺激による影響が観察できなかった原因としては刺激電圧の弱さと刺激インターバルの問題であると推測される。したがって今後刺激電圧は徐々に上昇