

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：23201  
研究種目：基盤研究(A) (一般)  
研究期間：2018～2021  
課題番号：18H03759  
研究課題名(和文) MEMSセンサ・アクチュエータによるフィードバックを用いた心筋細胞の拍動力学計測  
  
研究課題名(英文) Measuring the mechanics of cardiomyocyte beating with feedback control using MEMS sensors and actuators  
  
研究代表者  
下山 勲 (Shimoyama, Isao)  
  
富山県立大学・その他・学長  
  
研究者番号：60154332  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,900,000円

研究成果の概要(和文)：MEMS力センサを用いて細胞の収縮を計測できるセンサシステムを構築し、ヒトiPS細胞由来の心筋細胞の拍動を計測した。このセンサシステムには、細胞に伸展刺激を与える機能が備わっており、センサ信号を用いて伸展量をフィードバック制御することができる。細胞の伸展量が大きいほど、拍動力が強くなることを実験的に示した。このことは、フランク・スターリング則が細胞レベルで成立することを意味する。フィードバック制御を利用して、心筋細胞に増力収縮および等尺収縮をさせることができた。また、低温になるほど拍動周期が長くなり、20℃前後で拍動が停止することを確認した。これは多くの哺乳動物の心臓に類似した性質である。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓の機能や状態を調べるために、臓器レベルでも細胞レベルでも電気化学的なアプローチが一般的である。しかし、心臓の機能がポンプという力学的機能である以上、容積や圧力(細胞レベルでは長さや収縮力)の時間的変化やその温度依存性などを直接調べることも重要である。本研究で構築したセンサシステムはそうした実測を可能とし、フランク・スターリング則が細胞レベルでも成り立つことや、20℃で心停止する現象が細胞由来であることを実証した。このセンサシステムと方法論は心筋細胞の力学的性質を直接計測することを可能とし、今後心筋細胞の特性解明に貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We constructed a sensor system that can measure cell contraction using a MEMS force sensor and measured the beating of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hiPSC-CMs). This sensor system is equipped with a function to stimulate cells to stretch, and the sensor signal can be used for feedback control of the amount of stretching. Experimental results showed that the greater the amount of cell extension, the stronger the beating force. This means that the Frank-Starling law is valid at the cellular level. Using feedback control, we were able to induce cardiomyocytes to undergo auxotonic and isometric contractions. We also observed that the beating cycle became longer at lower temperatures, and the beating stopped at around 20 degrees C. This is a property similar to that of many mammalian hearts.

研究分野：ロボティクス

キーワード：MEMSセンサ iPS細胞由来心筋細胞 拍動力学 伸展刺激 フィードバック制御

### 1. 研究開始当初の背景

心臓が拍動する際に、心室の圧力と容積の関係 (Pressure-Volume Relationship; PVR) が前負荷によってどのように変化するかは、心機能を解明する上で非常に重要である。心臓の構成要素である心筋細胞はその内部に筋節 (サルコメア) 構造を持ち、単一細胞でも自律的に拍動する特異な細胞である。心筋の収縮構造であるサルコメアには、心室の前負荷が増すと拍動に伴う力学的仕事も増大するという重要な生理的調節機構 (フランク・スターリング則) が備わっている。前負荷が大きいくほど、拍動により心臓がする力学的仕事は大きくなる。しかし、フランク・スターリング則の細胞レベルでの力学的メカニズムは解明されていない。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、相対変位する2つの微小プレート上に心筋細胞の両端をそれぞれ接着し、プレートを介して細胞に働く力あるいは変位を、他方の値と細胞の状態推定量とともにフィードバック制御することで、心臓内の力学的境界条件を再現し、心筋細胞の力学的性質、特に前負荷と力 - 長さ関係 (Force-Length Relationship; FLR) との相関を精細に計測・解析する。

### 3. 研究の方法

本研究では、心筋細胞外部の境界条件として、外部弾性率を時間変化も許して計測対象となる心筋細胞に与えながら、心筋細胞の FLR を計測する。境界条件として弾性率を与える方法は、心筋細胞の力と変形量を計測しながら、外部弾性率に対応する力と変位になるようリアルタイムでフィードバック制御する。計測の結果として生理的条件下での心筋細胞の拍動を FLR ダイアグラム上の軌跡として表現し、それが、外部弾性率 = 負荷の強さとどのような相関関係にあるかを正確に解析する。

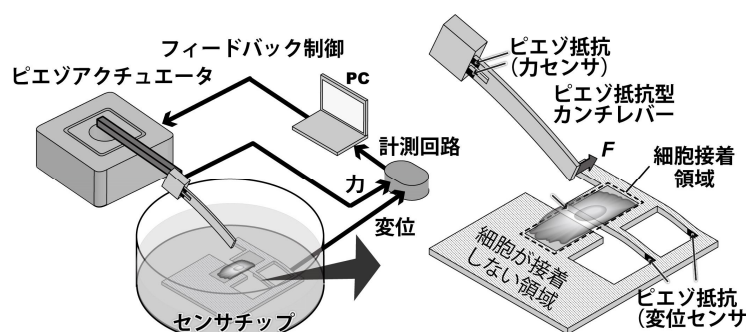


図1 心筋細胞の拍動計測のための実験セットアップ

具体的にはまず、シリコンで形成した可動培養基板上に心筋細胞を接着させる (図1)。この基板は固定部と可動部の2つで構成されており、細胞は両者をまたがるように接着する。心筋細胞が拍動すると可動部が変位し、これを piezoelectric 抵抗型カンチレバーで計測する。カンチレバー自体も piezoelectric アクチュエータで変位させることができるので、細胞に伸展刺激を与え、強制的に引き伸ばすことができる。可動培養基板とカンチレバーのバネ定数はあらかじめ計測するので、細胞の拍動力も算出することができる。センサ信号は FPGA により解析されるだけでなく、その値に応じて piezoelectric アクチュエータをフィードバック制御することが可能となっている。

具体的にはまず、シリコンで形成した可動培養基板上に心筋細胞を接着させる (図1)。この基板は固定部と可動部の2つで構成されており、細胞は両者をまたがるように接着する。心筋細胞が拍動すると可動部が変位し、これを piezoelectric 抵抗型カンチレバーで計測する。カンチレバー自体も piezoelectric アクチュエータで変位させることができるので、細胞に伸展刺激を与え、強制的に引き伸ばすことができる。可動培養基板とカンチレバーのバネ定数はあらかじめ計測するので、細胞の拍動力も算出することができる。センサ信号は FPGA により解析されるだけでなく、その値に応じて piezoelectric アクチュエータをフィードバック制御することが可能となっている。

### 4. 研究成果

#### (1) 心筋細胞の拍動を計測するための実験方法の確立

iPS 細胞由来心筋細胞を強制的に伸展させたときの拍動力を計測し、その結果から拍動波形などを分析した。細胞は 60mm ディッシュ内で行った。ディッシュの底に可動培養基板を接着し、培養前に 70% エタノールおよび紫外線 (1 時間) による滅菌を行った。基板上に細胞が接着しやすくするために、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のフィブロネクチンに乗せ、37  $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間コーティングした。次に、可動培養基板上に iPS 細胞由来心筋細胞 (MiraCell CMs from ChiPSC12、タカラバイオ) を播種し、播種後 1 週間してから拍動力の計測を実施した。

計測は顕微鏡上に設置した卓上インキュベータ内で行い、ディッシュ内を温度 37  $^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$  濃度 5% に保つようにした。図2は計測直前の心筋細胞の様子を蛍光顕微鏡により観察したものである。心筋細胞のアクチン繊維をファロイジン (Alexa Fluoro 488-Phalloidin, Thermo Fisher Scientific) で、核をヘキスト (Hoechst 33342, 同仁化学) で、それぞれ染色し

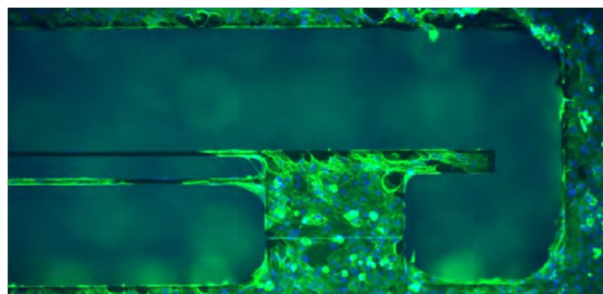


図2 可動培養基板上に培養した心筋細胞 (蛍光観察)

て撮影した。

心筋細胞の拍動による可動培養基板の可動部の変位を測定する方法について説明する。図3に示すように、可動部の先端には突起が設けられており、ここにピエゾ抵抗型カンチレバー(カセンサ)を引っかける。カセンサはあらかじめキャリブレーションされており、電気信号の値から変位および力を算出することができる。細胞の拍動により可動部が変位すると、カンチレバーの先端も同じ量だけ変位し、ピエゾ抵抗層の電気抵抗率が変化する。この抵抗率の変化をブリッジ回路により電圧信号へと変換し、データロガーで検出する。このようにして得られた変位の時間変化を図3に示す。周期的な拍動が正確に捉えられていることがわかる。

## (2) 伸展刺激を与えた際の心筋細胞の拍動

背景において述べたように、臓器としての心臓にはフランク・スター

リング則と呼ばれる生理的調節機構が備わっており、心室の前負荷が増すと拍動に伴う力学的仕事が増大する。この調節機構のしくみを解明することは、神経生理学的に非常に重要な課題とされている。特に、こうした機構が心筋細胞固有の機能によるものか、あるいは神経やホルモンの作用が寄与しているのかを切り分けることの意義は大きい。

そこで私たちは、心筋細胞に前負荷に相当する強制的な伸展刺激を与え、拍動の強さや速さ、あるいは規則性にどのような変化が生じるかを実験的に調べた。前出の力センサは細胞の拍動による力や変位を計測すると同時に、細胞に強制的な伸展負荷を与えることが可能となっている。つまり、センサ自体がピエゾアクチュエータに固定されており、アクチュエータをFPGA制御することによりセンサを移動させることができる。

センサを移動させることで可動培養基板の固定部と可動部とのギャップを変化させながら、つまり細胞を強制的に伸展させながら、拍動によるカンチレバーの変位を計測した(図4)。センサを所定の位置に固定した状態を10秒間維持し、センサを10 $\mu\text{m}$ 変位させるという操作を繰り返した。センサの位置を0 $\mu\text{m}$ から80 $\mu\text{m}$ まで変位させたのちに、再び0 $\mu\text{m}$ まで戻した。センサの変位が最大の80 $\mu\text{m}$ のとき、カンチレバー自体の先端の変位は約65 $\mu\text{m}$ であり、可動培

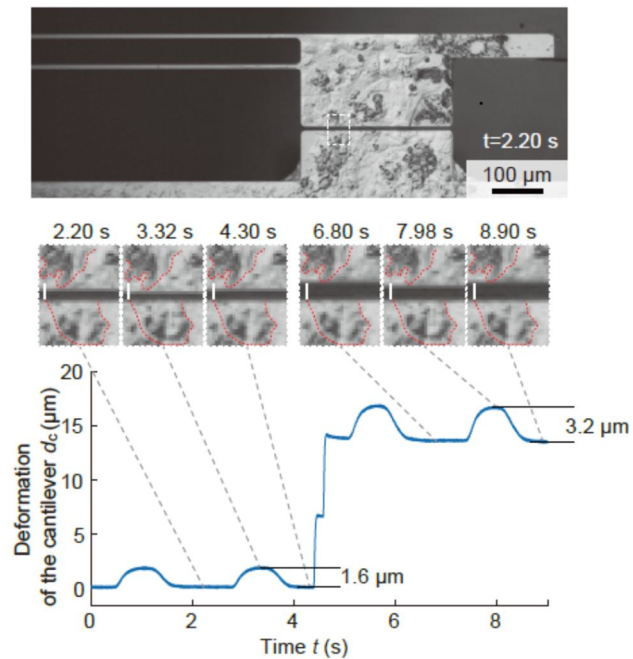


図3 播種した心筋細胞の顕微鏡観察(微分干渉像)と計測された変位の時間変化

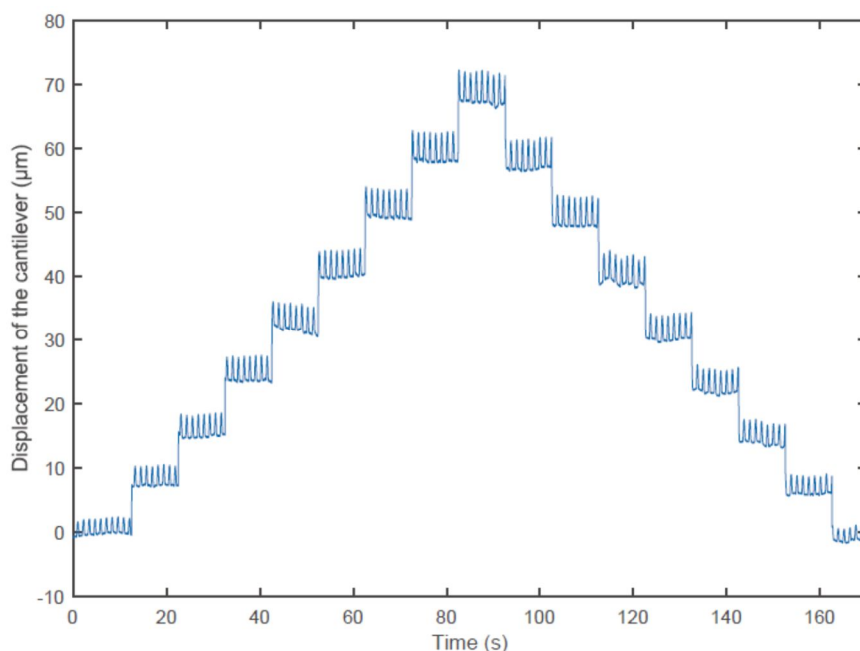


図4 心筋細胞に強制的伸展を与えたときの拍動力

養基板の変位、つまり細胞の伸展量は約 15  $\mu\text{m}$  であったと推定される。

伸展量に応じて拍動力があきらかに強くなっていることがわかる。カンチレバーと可動培養基板のばね定数を考慮して、拍動力に換算すると、センサ位置 0  $\mu\text{m}$  のときに約 9  $\mu\text{N}$ 、センサ位置 80  $\mu\text{m}$  のときに約 18  $\mu\text{N}$  であった。

### (3) 温度による心筋細胞の拍動の変化

心臓は温度に応じて拍動を変化させる。心筋細胞はイオンチャネルを介して、小胞体内および細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を調整し、それによって拍動を制御している。細胞内外の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は細胞膜上のイオンチャネルにより調整されるが、それ以外に筋小胞体も  $\text{Ca}^{2+}$  を排出し、細胞活動における重要な役割りを担っている。しかし、低温になると細胞の代謝が低下し、 $\text{Ca}^{2+}$  の流入が遅くなり、拍動頻度が低下する。心臓の機能については古くから電気化学的な調査研究が行われ、上記のような温度に対する多くの知見が得られている。一方、心筋細胞レベルで力学的な実験が行われた例は限られており、定量的な議論があまりされていない。

私たちは心筋細胞の拍動を定量化するために構築したセットアップを利用して、温度変化に対する心筋細胞のふるまいを詳しく調べた。図5はその一例であり、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の温度を 20~28 と変化させたときのセンサ信号を時間に対してプロットしたものである。温度によっては若干不規則な拍動であるが、脈拍数にすると 20 で 3 回/分、24 で 8.3 回/分、28 で 16 回/分であった。

心筋細胞レベルでの拍動の速さは不安定であり、細胞群によって脈拍数は大きく異なる。私たちは異なる多数の細胞群に対して同様の測定を行ったが、例えば 36 での脈拍数は 35 回/分程度のもから 100 回/分程度のもまでが観測された。しかしいずれの場合でも、温度と拍動周波数(脈拍数の逆数)との間にはかなりきれいな線形性が見られ、20 程度で拍動が停止する点も共通していた。ヒトなどの哺乳動物では 20 前後で心停止することが知られており、この特徴が細胞レベルでも成立することが実証された。一方、クマヤリスなどのように冬眠する哺乳動物では低温での心停止は起こらないことから、今後これらの動物の心筋細胞についても同様の実験を行い、ヒト心筋細胞と比較することも期待される。

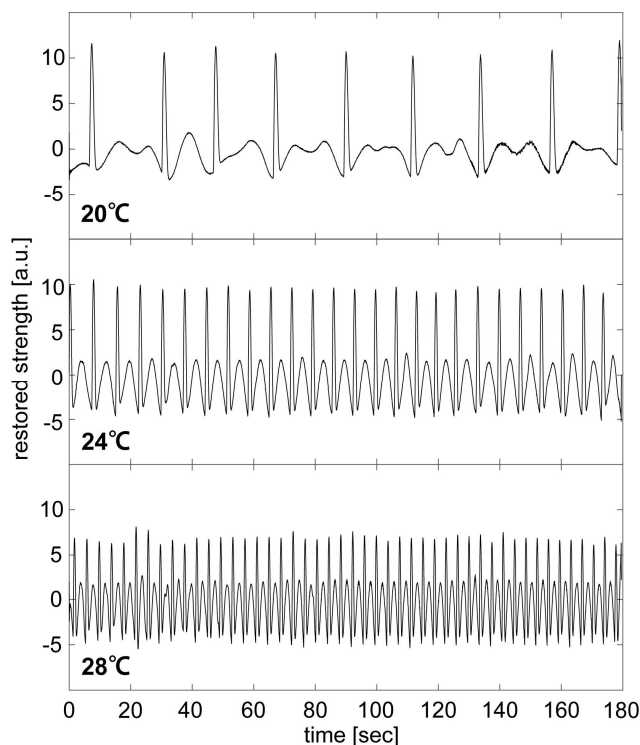


図5 温度を変化させたときの心筋細胞の拍動

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kenei Matsudaira, Hidetoshi Takahashi, Kayoko Hirayama-Shoji, Thanh-Vinh Nguyen, Takuya Tsukagoshi, and Isao Shimoyama	4. 巻 29
2. 論文標題 A MEMS-based measurement system for evaluating the force-length relationship of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes adhered on a substrate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Micromechanics and Microengineering	6. 最初と最後の頁 055003-1, -8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kenei Matsudaira, Hidetoshi Takahashi, Kayoko Hirayama-Shoji, Takuya Tsukagoshi, Thanh-Vinh Nguyen, Isao Shimoyama	4. 巻 32
2. 論文標題 Isometric contraction force measurement of hiPSC-CMs on a movable plate with a feedback-controlled MEMS cantilever probe	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Measurement Science and Technology	6. 最初と最後の頁 115118 ~ 115118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1361-6501/ac15dd	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 池上怜太・塚越拓哉・野田堅太郎・玉本拓巳・小柳健一・大島徹・松平謙英・下山勲
2. 発表標題 MEMS力センサによるヒトiPS細胞由来心筋細胞の拍動計測
3. 学会等名 電子情報通信学会 電子デバイス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuaki Ishii, Takuya Tsukagoshi, Nguyen Thanh-Vinh, Kayoko Shoji Hirayama, Tomoyuki Takahata, and Isao Shimoyama
2. 発表標題 The Measurement of the Vibration of Human iPS Cell-Derived Cardiomyocytes' Contraction
3. 学会等名 The 32nd IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池上怜太・松平謙英・塚越拓哉・野田堅太郎・玉本拓巳・小柳健一・大島徹・下山勲
2. 発表標題 MEMS力センサを用いたヒトiPS細胞由来心筋細胞の拍動計測
3. 学会等名 電気学会 電子・情報・システム部門大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関