

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：32601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K20113

研究課題名（和文）メゾスケールにおける心臓への長期的物理刺激に対する生理的・生物学的応答の探査

研究課題名（英文）EFFECTS OF MECHANICAL STIMULUS ON BEAT SEQUENCE OF CARDIOMYOCYTES WITH FEEDBACK CONTROL

研究代表者

三井 敏之（Mitsui, Toshiyuki）

青山学院大学・理工学部・教授

研究者番号：40406814

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：鶏胎児心臓の組織片において、心房と心室の自律拍動の違いを示した。次に、ペアリング（心房-心房、心室-心室、心房-心室）による拍動の同期化について、40h以上の観測を行い解析した。ペア種による同期の確率と同時時間に予想以上の差が出た。リエントラント的な不整脈が心房-心室の種に多く観測された。心筋細胞の集合体の自律拍動をリアルタイムで光学的観測をしながら、高速画像処理により拍動の物理的パラメータを読み取る装置を構築した。そして、自律拍動に対して同位相、逆位相、または自律拍動の直前等の位相差を固定した物理的刺激（フィードバック）を与えるプローブを付加した。長期的な刺激において位相差の違いが表れた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎児期における心臓のメカノセンシングは発生形状変化において重要と示唆されてきた。我々は組織片ペアの同期化の実験結果において、ペアの接触面における動きが同期化に重要であることを発見した。これは直接的に動きがリズムの安定化に寄与することを示す。また、心房-心室のリエントラント的振る舞いはin vitroの系としてドラッグテスト等への応用が期待できる。次に培養環境下の長期的観測と高速画像処理により構築したフィードバック機構付きの外部刺激装置の完成は筆者の知る限り世界初である。この装置による自律拍動と常時同調した刺激により、発生に近い集団的心筋細胞の形状変化や線維芽細胞の異方的増殖を期待する。

研究成果の概要（英文）：We presented the beat dynamics in sub-mm tissue fragments from atria and ventricles of hearts from chick embryos. The inter-beat intervals and the response to mechanical stimulus are different by the regions. The major finding of this study is synchronization of these fragment pairs physically attached to each other. The probability of achieving this and the time required differ for regional pairs: atrium-atrium, ventricle-ventricle, or atrium-ventricle. Our observation indicates that mechanical stimulus at fragment boundaries induces synchronization. A reentrant-like beat sequence, applicable to testing drugs, is frequently observed during synchronization. To investigate the effects by mechanical stimulus further, we built an instrument applying probe stimuli to cardiac cells. In addition, we successfully added a feedback control to adjust the phase between stimulus and intrinsic beating by fast image processing. This novel instrument shows the phase differences of the responses.

研究分野：生物物理、ナノテクノロジー

キーワード：心臓 リズム 不整脈 同期化 リエントラント 心筋細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心臓全体の拍動と、その安定化において Mechanoelectro - feedback(動きを含む制御)機構が物理的メカニズムとして提唱されていた。一方実験では比較的大きな豚の心臓細胞などの単一細胞を用いて、ストレッチによる自律拍動や、活動電位の変化を調べる実験が行われていた。その結果として力学的刺激に応答する PIEZO や SAKCA チャネルが発見された。つまり、Mechanoelectro - feedback の素子が見つかった。しかし、この機構の安定には細胞間のシグナル伝達と力学的変位の相関を調べるのが大切である。しかし、近年、集団としての心臓の細胞と力学的刺激との相関を調べる実験はない。古くからバルクとしての心臓に衝撃を与える実験は存在するが、中間(メソスケール)の領域における、刺激応答の実験は存在しない。そこで、本研究課題では、物理的刺激に応答する心臓の細胞の集合体、組織片、ニワトリ胚の心臓に刺激を与える装置を開発して、その刺激に対する応答を観測する。観測自体を、培養環境下に構築することで、観測時間の長期化を図る。

2. 研究の目的

(1) Mechanoelectro feedback 機構を調べるために、sub mm のメソスケールにおける心臓の組織片や細胞の集団の動きや、それらの同期化について調べて、動きと同期の関係を調べる。そのために、近年の観測技術の向上や自動高速画像処理の恩恵を受けて、長時間(~ 48h)の拍動観測を可能とする装置をインキュベーター内に構築する。

(2) 培養下にて、心筋 + 繊維芽細胞の共培養へ、力学的刺激を与え、その影響を 24h 以上にわたり長期的に観測装置を開発する。力学的刺激は、バイモルフ (PZT) にタングステンプローブを付けて、心筋細胞の組織片や細胞の集合体の自律拍動に似せたモーションを再現する。

(3) in ovo , Shell-less と呼ばれる、ニワトリ胚の殻内成長を実験系に取り入れて、刺激を与える実験系を確立する。この in vivo の系は、上記の二つの in vitro と対比して、発生における刺激の影響を調べる。

(4) リアルタイム画像プロセッシングにより、自律拍動を行う細胞の集合体に対して、自律拍動の位相に合わせて、力学的 probe 刺激を与える装置を構築する。ここでは、力学的刺激と自律拍動の位相差を自動で調整することにより刺激の影響を最大限に引き伸ばすことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 組織片の長期的観測をインキュベーター内で行うために、dinolite USB 顕微鏡により、6 well の容器内カルチャーインサート上の組織片を長時間(~ 48h)にわたり、その拍動観測するシステムを構築する。連続的な LED ライトの照射は、ライト自身やライト照射による顕微鏡の温度上昇が、容器内の培地蒸発を引き起こすので、ライト照射は動画取得時のみとする。この制御系は LabView をプラットフォームとする。インキュベータを購入して、その中にメカニカルな振動をダンピングする機構を付加する必要がある。まずは単一組織片の拍動観測、そして二つの組織片(ペア)の接触による同期について調べる。そして部位による違いを確認する。

(2) 心筋 + 繊維芽細胞の共培養により発生する心筋細胞の集合体に、周期的な力学的刺激を与える。刺激に使用するのはタングステンプローブで、その動きは自律拍動の動きに似せる。近隣に他の自律拍動をする心筋細胞の集合体があるような、力学的な変位を与えたいからである。そのために、典型的な自律拍動の動画を取得して、心筋細胞の集合体の自律拍動のモーションのデータベース化を行い、そのデータに基づいて、それを“任意波形”として、タングステンプローブに、その任意波形の電圧を与える。これをここでは周期的な刺激とよび、長時間の観測は、(1)と同様の観測系を用いる。タングステンプローブの粗動は、プロトタイプとして手動のマイクロマニピュレータを使用する。

(3) ニワトリ胚の殻内成長の観測を行うために、in ovo と Shell-less の殻外培養の手法を試したが、個体によって、胚心臓の自律拍動の安定に大きな差があり、そこで、本課題では、2019 年度より世界初の殻外培養・孵化に成功して話題となった田原豊氏による手法を導入する。また、観測に関しては、実体の顕微鏡では心臓の形状を二次元でしか観測できないため、当初の研究計画にはないが、OCT (Optical Coherence Tomography: 光干渉断層撮影)による観測を導入する。

(4) 本研究課題のハイライトであるリアルタイム画像プロセッシングによって、刺激のタイミング(自律拍動と刺激の位相差)を制御する機構の構築を行う。拍動間隔に比べて、このフィードバックの時定数が、拍動間隔に比べて速くないと、効果的に位相差の制御ができないので、いかに画像処理に無駄なインストラクションを省くことが必要である。こちらもこの制御系は

LabView をプラットフォームとする。

4. 研究成果

(1) 組織片のメソスケールとして、day 10 の組織片 (300 μ m) の長期的拍動観測 (96h 連続) に成功した。そして、心房と心室の二つの部位に起源をもつ組織片の自律拍動の違いを実験的に評価した。次に、二つの組織片を接触させて、長期的に観測しながら培養を継続すると、互いに拍動が同期することを発見した。また、ペア種(心室 - 心房、心房 - 心房など)によって拍動の同期化時間が異なった。図 1 に心室 - 心房ペアが同期するまでの、それぞれの拍動間隔を散布図として示す。当初は、独立して拍動をしていた二つの組織片だが、数時間後から心房の拍動間隔が、1 ~ 4 秒当たりと、大きく振れ、一方で心室は 40h まで安定した拍動を行い、最終的には心室の拍動を引きずり込んで同期した。他の部位間のバリエーションも含めて、同期する前の拍動の動きをオプティカルフローにより、時間を追って調べたところ、二つの組織片の接触部分の“動き”が同期に重要であることを発見した。[S. Arai and T. Mitsui, Bioeng. J7(3): 81, 2020]。また、副産物として、リエントラントと呼ばれる、1 拍動サイクル内に局所的に二回拍動する箇所が存在する不整脈を、心房 - 心室の種に多く観測した。この結果を数値計算で示すために、有限要素法によるシミュレーションを導入した[S. Hashiguchi and T. Mitsui, 計算工学, 23(1) 3712, 2018]。

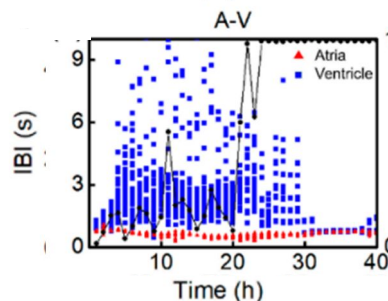


図 1. 心房(atria)と心室(ventricle)の同期

(2) タングステンプローブによる周期的な力学的刺激を長期的に与えると、拍動間隔の不安定化から安定化に向かう。図 2. にその様を示す。11 時間以降は安定化した。刺激への同期化は部分的にしか起こらず、位相が程度ずれたタイミングで自律拍動が観測された。しかし、プローブを止めると、また拍動間隔が不安定化した。刺激を受ける細胞の集合体は厚くなり、抗体染色により、共培養の繊維芽細胞が筋線維芽細胞に分化したことがわかった。疾患時に同様の現象が起こることは知られている。刺激のタイミングを避けるように拍動を行うので、(4) で説明するように、自律拍動と刺激のタイミングをリアルタイムで制御する必要がある。

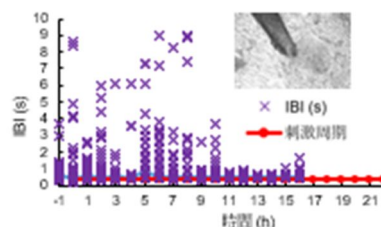


図 2. 周期的刺激. 不安定期からの安定化

(3) 田原氏による殻外培養法と OCT の導入により、ニワトリ胚の心臓のトモグラフに成功した。選考実験によるエタノールによる不整脈化を確認した。心臓への力学的刺激の導入を試みたが、胚が予想以上に動きまわり、刺激の種を変更する予定である。しかし、in vivo の系における研究の発展が期待できる。

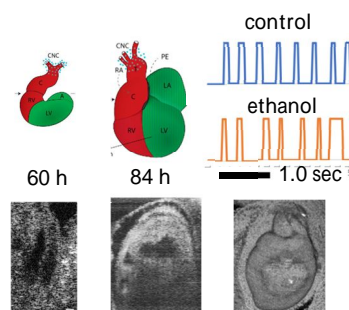


図 3. 心臓の OCT 像とエタノールによる不整脈化.

(4) リアルタイム制御によるプローブ刺激の結果は、位相差により大きく変わった。典型的な心筋細胞の集合体の振る舞いを図 4. に示す。刺激を同位相にすると、拍動間隔が短くなり、刺激なしの場合、拍動間隔は長くなるので、刺激の影響と判断できる。一時的に刺激を止めても自律拍動を維持した。しかし、9h 以降は、刺激中は拍動間隔が一定だが、刺激を止めると不整脈の兆候が観られた。一方で、位相差が π の場合、最初の刺激直後から、一時的な刺激停止時に不整脈が起こり、刺激が trigger となった。3h 後あたりでは拍動間隔が二倍程度に長くなり、その後、徐々に短くなった。6h あたりでは、刺激に追いつけるように拍動が早まり、9h あたりで刺激を止めた後も拍動間隔が変わらず一定になった。このように、リアルタイム制御によるプローブ刺激の応答は、位相差をパラメータにすると、10h 以上にもわたり異なった。そして、位相差が 0 の時は、刺激を止めると、自律拍動が不整脈を起こすので、明らかに刺激が自律拍動のリズムに影響を及ぼしていることが予想できる。心臓のように常に環境によって変化する器官に対する刺激の応答を調べるには、その変化に応じて、刺激のパラメータ(位相など)を調整するフィードバック機構が不可欠であることがわかった。

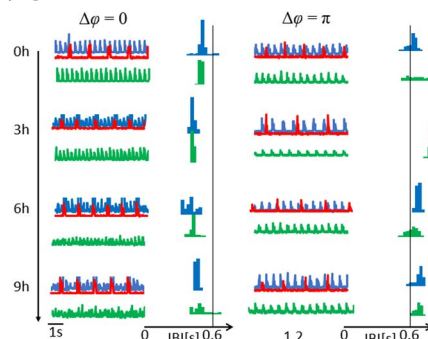


図 4. リアルタイム制御による刺激応答. 左、右図は位相差を 0、 π とした。青線は拍動、赤線は刺激、緑線は一時的に刺激を off にした際の自律拍動。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akita, M, Kono, T, Lloyd, K, Mitsui, T, Morioka, K, Adachi, K	4. 巻 43
2. 論文標題 Biochemical study of type I collagen purified from skin of warm sea teleost Mahi mahi (Coryphaena hippurus), with a focus on thermal and physical stability.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Food Biochem	6. 最初と最後の頁 e13013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jfbc.13013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ishida Kentaro, Mitsui Toshiyuki	4. 巻 2
2. 論文標題 Role of the boundary in feather bud formation on one-dimensional bioengineered skin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 APL Bioengineering	6. 最初と最後の頁 016107 ~ 016107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.4989414	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 橋口 真宜、三井 敏之	4. 巻 Vol. 23 No. 1
2. 論文標題 COMSOL Multipysicsによる計算科学工学- 生物系	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 計算工学	6. 最初と最後の頁 3712 ~ 3721
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 無
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 Shin Arai, Kento Lloyd, Tomonori Takahashi, Kazuki Mammoto, Takashi Miyazawa, Kei Tamura, Tomoyuki Kaneko, Kentaro Ishida, Yuuta Moriyama, Toshiyuki Mitsui	4. 巻 7
2. 論文標題 Dynamic Properties of Heart Fragments from Different Regions and Their Synchronization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioengineering	6. 最初と最後の頁 1 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/bioengineering7030081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Shota Nozaki, Kazuki Mammoto, Ryu Kidokoro, Ryuta Watanabe, Yuuta Moriyama, Toshiyuki Mitsui
2. 発表標題 Mechanical stimulus with real-time feedback on beating cardiac cells
3. 学会等名 APS March Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryo Kidokoro and Toshiyuki Mitsui
2. 発表標題 EFFECTS OF MECHANICAL STIMULUS ON BEAT SEQUENCE OF CARDIOMYOCYTES WITH FEEDBACK CONTROL
3. 学会等名 65 th Biophysical Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺 隆太、守山 裕大、三井 敏之
2. 発表標題 自己組織化過程における細胞挙動の解析
3. 学会等名 第68回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野崎 庄太、万本 和輝、城所 龍、渡辺 隆太、守山 裕大、三井 敏之
2. 発表標題 リアルタイムフィードバック制御による力学的刺激に影響を受けた心筋細胞の拍動
3. 学会等名 第68回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 城所 龍、宮沢 高司、野崎 庄太、渡辺 隆太、万本 和輝、守山 裕大、三井 敏之
2. 発表標題 心筋細胞と線維芽細胞の共培養におけるダイナミクス
3. 学会等名 第68回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野崎 庄太, 万本 和輝, 宮沢 高司, 渡辺 隆太, 守山 裕大, 城所 龍, 三井 敏之
2. 発表標題 Beat sequence of cardiomyocytes affected by to mechanical stimulus with real-time feedback control
3. 学会等名 The 58th Annual Meeting of the BSJ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 万本 和輝、宮沢 高司、山本 あゆ美、新井 晋、守山 裕大、三井 敏之
2. 発表標題 Real-Time Feedback機構を備えた刺激システムの構築と心筋細胞集合体に対する機械的刺激による異方性の形成
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 永田 佳世、宮沢 高司、新井 晋、上原 貴宏、守山 裕太、三井 敏之
2. 発表標題 Rocking Shaker を用いた心筋細胞パターンニングと選択性の向上
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 宮沢 高司、上原 貴宏、新井 晋、永田 佳世、守山 裕大、三井 敏之
2. 発表標題 線形培養した心筋細胞集合体の拍動の観測
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 万本 和輝，崔 東学，吉村 玲子，大林 康二，三井 敏之
2. 発表標題 SS-OCTによるE4～E10の鶏心臓のイメージング
3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮沢 高司，万本 和輝，新井 晋，上原 貴宏，三井敏之
2. 発表標題 心筋細胞への機械的刺激とその制御システム
3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 万本 和輝，崔 東学，吉村 玲子，大林 康二，三井 敏之
2. 発表標題 高速SS-OCTによる鶏心臓のイメージング
3. 学会等名 第79回応用物理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Miyazawa, Shin Arai, Takahiro Uehara, Shogo Yahagi, Toshiyuki Mitsui
2. 発表標題 Long-term influence of external mechanical stimulus on cardiomyocyte aggregations
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shin Arai, Tomoyuki Kaneko, Toshiyuki Mitsui
2. 発表標題 Synchronization processes of cardiac tissue fragment pair and the regional differences in the heart
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shin Arai , Takahiro Uehara , Nanaho Kawai , Takashi Miyazawa , Shogo Yahagi , Kentaro Ishida , Toshiyuki Mitsui
2. 発表標題 Influence of periodical mechanical stimulus on cardiac cell aggregates
3. 学会等名 APS March Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上原貴宏, 新井晋, 宮沢高司, 矢作祥吾, 三井敏之
2. 発表標題 心筋細胞集合体への周期的な機械的刺激が引き起こす影響
3. 学会等名 第65回応用物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮沢高司, 新井晋, 上原貴宏, 矢作祥吾, 川井南歩, 三井敏之
2. 発表標題 心筋細胞集合体への機械的に対する応答
3. 学会等名 第65回応用物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 新井晋, 上原貴宏, 矢作祥吾, 宮沢高司, 三井敏之
2. 発表標題 周期的プローブ刺激による心筋細胞集合体の拍動周波数の維持
3. 学会等名 第65回応用物理学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

青山学院大学理工学部三井研究室ホームページ http://www.phys.aoyama.ac.jp/~w3-mitsui/topics.html 当方の研究室ホームページ http://www.phys.aoyama.ac.jp/~w3-mitsui/Mitsui_Lab@Aoyamagakuin_University http://www.phys.aoyama.ac.jp/~w3-mitsui/topics.html
--

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
---------	---------