

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19902

研究課題名（和文）自律神経活動変調に起因する心房細動発症機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism elucidation of atrial fibrillation caused by hyperactivated autonomic nervous system

研究代表者

神保 泰彦（Jimbo, Yasuhiko）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・教授

研究者番号：20372401

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）：自律神経系の活動変調による心房細動の発症機序の解明に向けて、培養心筋細胞の興奮伝播を空間パターンに着目して解析した。結果、心筋細胞の純度や密度に依存してリエントリー様の活動が発生することを示した。さらに、高密度に電極を配置した計測デバイスを用いてヒト心筋細胞の伝播パターンを解析したところ、同じ位置でも伝播の方向によって伝播速度が異なることを示した。以上は、不整脈発生の機序解明に向けて重要な知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果は、培養環境でも不整脈の一種であるリエントリーに類似した活動伝播が発生すること、および興奮の伝播速度が伝播の方向に依存して変わることである。前者は疾患を培養皿の中でモデル化できる可能性を示した点で学術的・社会的に重要である。後者は、健常な心臓で起こっている興奮伝播が、伝導経路の微小な変化から不整脈へと変化していく機序となりえる点で重要である。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism of atrial fibrillation caused by hyperactivation of autonomic nervous system, we studied the excitation propagation in cultured cardiomyocytes, focusing on the spatial pattern. Results showed that re-entry-like propagation occurred depending on the purity and density of cardiomyocytes. Furthermore, we analyzed the propagation pattern of human cardiomyocytes using a high-density microelectrode array which has higher electrode density than conventional microelectrode arrays. The propagation velocity of cardiac activity varied depending on the direction of propagation even at the same position. These findings are important for elucidating the mechanism of arrhythmogenesis.

研究分野：神経工学

キーワード：脳神経疾患 細胞・組織 シグナル伝達 ナノバイオ

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

心房細動は最も症例の多い心疾患であり、発作性（1週間以内に自然に治まる）から持続性（治療によって正常洞調律に戻る）、永続性（治療効果がない）へと段階的に進行することが知られているが、早期段階においては器質的な原因が認められない症例（孤立性心房細動）が少なくないことがわかってきた。孤立性心房細動はストレスの持続と相関が高いとされ、自律神経系による心拍制御システムの関与が示唆される。緊張状態—交感神経優位—では心拍が上昇し、リラックスしたとき—副交感神経優位—には低下することは日常的に経験されることであり、そのバランスが崩れた状態の長期間の継続が心疾患を誘導する要因になり得ることは容易に想像できるが、生理学的なメカニズムは不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、不整脈発症メカニズムを明らかにすることを目指した。不整脈の状態として、先行研究では活動電位の波形や拍動のリズムといった時間的なパターンが評価されてきた。一方、伝導経路の異常が心臓全体での異常な興奮を引き起こすとの観点から、本研究では活動電位の空間的な伝播パターンの異常に着目した。以上を基に、電気活動の計測から、不整脈様の活動の発生時・終了時の特徴を可視化すること、および不均一な細胞集団における活動伝播経路の可視化を目的とした。

## 3. 研究の方法

培養領域と計測電極の配置の工夫によるリエントリー現象の観察、および高密度に電極を配置した細胞外電位の計測デバイス high-density microelectrode array (HD-MEA)を用いた活動伝播の計測の2点について実験を行った。

## 4. 研究成果

### 1) 培養領域と計測電極の配置の工夫によるリエントリー現象の観察

これまでに用いていた計測デバイスは、2 mm 四方程度の計測領域に 64 点の電極を配置しており、直径 10 mm 程度の範囲に培養した心筋細胞から活動を計測していた。心筋組織にリエントリーが発生したとしても、培養領域に対する計測領域の比率が低かった場合は、計測領域を一方方向に興奮波が通過した様子が計測される。一方、計測領域の比率が十分に高い場合、培養領域における旋回波を計測できると考えられる。そこで、従来の電極よりも、疎に電極を配置した計測デバイスを作製した。電極間距離を従来の4倍とし、7 mm 四方の範囲に電極を配置した設計のデバイスを作製した。

試料における心筋細胞と非心筋細胞の比率、および細胞の密度が重要なパラメータと考え、心筋細胞のみが生存可能なグルコース不含培養液を用い

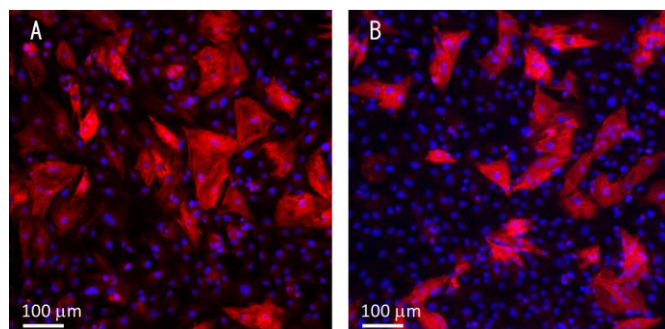


図 1 心筋細胞の状態. A) 純化した心筋細胞, B) control. 赤色が心筋細胞, 青色が細胞核を表す.

て心筋細胞を純化した試料を用意した。図 1 に培養結果を示す。赤色が示す CTNI タンパク質陽性の心筋細胞の比率は、純化群において高かった。一方、純化処理を行っていない control 群では、CTNI を発現していない細胞が多く見られた。

純化群の試料からは、計測中に活動の頻度が急激に変化する様子が見られた。図 2 に計測した活動を示す。173 秒あたりを境に活動の頻度が急激に低下した様子が見られる。図 2B および図 2C はそれぞれ赤色および青色で示した部分の活動の拡大図である。頻度が高い時間帯では、1 回 1 回の活動の間は明確ではなく、電極のどこかが常に活動を検知した状態であったと考えられる。一方、頻度が低い時間帯では活動間の境が明確であった。空間的な活動伝播のパターンを見ると、前者では計測領域を反時計回りに興奮が伝播する様子が見られた(図 2D)。一方、後者では、左上の電極を起点として興奮が広がっていく様子が見られた(図 2E)。以上から、頻度が高い時間帯の活動は、興奮が培養領域のどこかに常に存在し、周回していた状態であったことが示され、リエントリー様の活動が起こったことが示唆された。

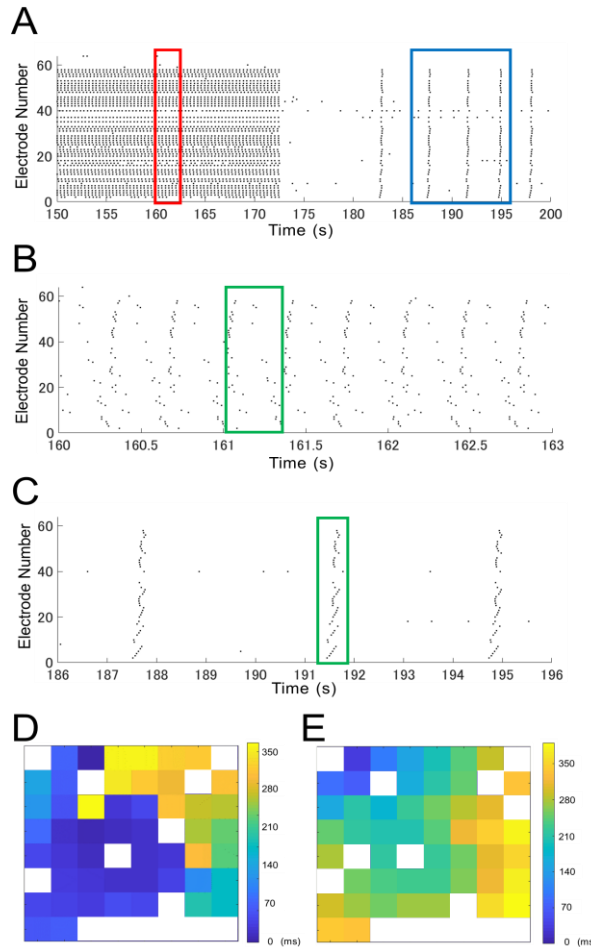


図 2 純化心筋組織における活動パターン。

さらに、活動パターンの遷移を詳細に評価するために、リエントリーが終了したタイミングにおける活動パターンを、リエントリー全体の活動パターンの平均と比較した。結果を図 3 に示す。平均的な伝播パターン(A)と比較して、リエントリーの最後の活動である 471 回目のパターンは右側の領域に遅れが生じていたことが読み取れ、興奮が伝わりにくい領域が出現したことがリエントリーの終了に関与したことが示唆された。

以上から、2次元平面上に培養したラット心室筋細胞を用いることで、リエントリー様の活動パターンを再現できることが示された。また、本研究では純化群と非純化群では、純化群でのみリエントリー様の活動が計測されたことから、細胞の組成や密度が重要な因子になることが示唆された。

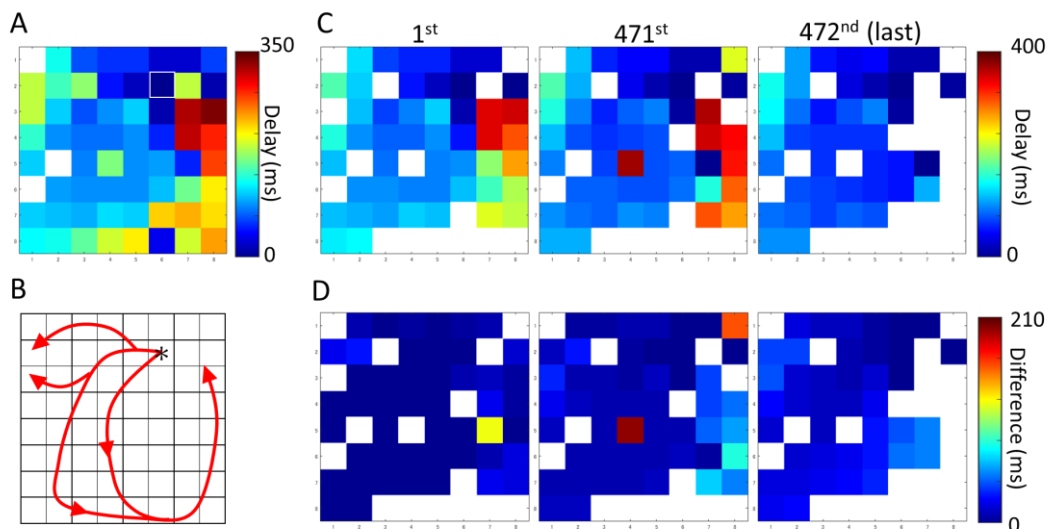


図 3 リエントリー様活動における活動パターン. D は平均的な伝播パターン(A)との差分を表す.

## 2) HD-MEA を用いた活動伝播の計測

さらに詳細に空間的な伝播パターンを評価するために、より高密度に多数の電極が配置された計測デバイス HD-MEA を導入した. また、試料としては、よりヒトの不整脈を正確に再現することを目指して、ヒト iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞を用いた. 疾患状態において起こる組織の不均一性を再現するために、活動伝播に寄与しないと考えられる繊維芽系の細胞(SNL76/7細胞)を心筋細胞と混ぜ合わせた細胞集団を調整した.

計測した活動を基に算出した伝播のパターンと、心筋細胞(CTNI, 赤色)と非心筋細胞(DDR2, 緑色)を免疫組織化学染色法により染め分けた画像を、位置情報を基に重ね合わせた. 結果を図 4 に示す. 心筋細胞の割合を、80, 90, 100%の条件でデータを取得した. 90%の条件(b)では、最も均一(等方的)に活動が広がった. 心筋細胞を100%とした試料(c)では培養途中で試料が凝集し、計測できた電極数が90%の条件と比較して少なかった. 80%の条件(c)では、心筋細胞が存在しない

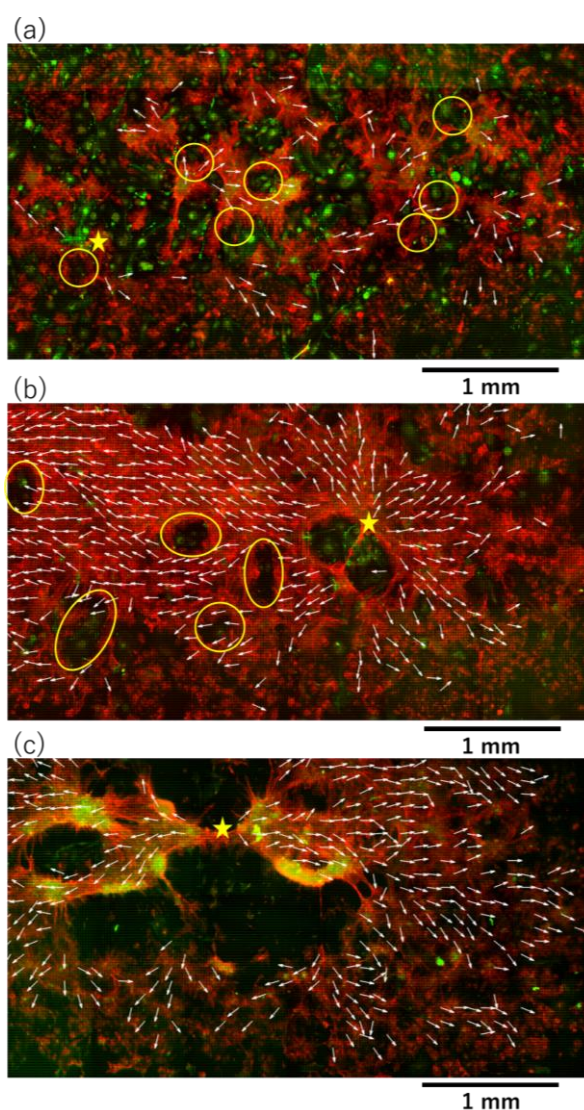


図 4 活動の伝播パターンと染色像の重ね合わせ.

場所に広い面積を持つ非心筋細胞が存在した。また、各画像における黄色の円は興奮波が分岐した個所を示す。リエントリー発生の一因が波の分岐と再合流であることが知られていることから、分岐箇所が多いほど不規則な活動が発生しやすいと考えた。最後に、活動伝播の特性について、より詳細に観察した。結果、同じ場所においても、伝播した方向によって伝播速度が異なることが分かった。以上から、培養条件に工夫が必要であるものの心筋細胞の割合を制御することで、様々な条件を作ることができた。

以上から、培養心筋細胞を用いることで、リエントリー様の活動が終了するメカニズム、興奮伝播の分岐と再合流、および伝播方向による速度の違いといった、心筋組織の機能異常につながりえる現象の観察に成功した。今後、自律神経系の異常を模した薬理刺激や、共培養した自律神経細胞からの入力を入れることで、今回見られた現象がどう変化するかを検討することで、不整脈発生の機序解明に貢献できると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 岡本美優、榛葉健太、加茂野照大、小谷潔、神保泰彦	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 培養心室筋モデルにおけるリエントリー様旋回波の再現と伝播パターン評価	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 電気学会論文誌C	6. 最初と最後の頁 -
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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡本，榛葉，石塚，小谷，神保
2. 発表標題 純化心室筋細胞におけるリエントリー様活動伝播の解析
3. 学会等名 電気学会医用・生体工学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石塚，酒井，榛葉，小谷，神保
2. 発表標題 心拍調整下における交感神経の賦活化による培養心室筋細胞の応答評価
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 2018年

1. 発表者名 岡本，加茂野，榛葉，小谷，神保
2. 発表標題 不整脈予測に向けた心筋 非心筋バランスと信号伝播パターンの比較
3. 学会等名 日本生体医工学学会関東支部若手研究者発表会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加茂野, 岡本, 榛葉, 小谷, 神保
2. 発表標題 培養心室筋モデルの電気活動計測によるリエントリー発生と線維化の関連性検討
3. 学会等名 日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本, 加茂野, 榛葉, 小谷, 神保
2. 発表標題 純化心室筋細胞の拍動伝播解析によるリエントリー発生・終了条件の検討
3. 学会等名 令和1年電気学会 電子・情報システム部門大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加茂野, 岡本, 榛葉, 小谷, 神保
2. 発表標題 リエントリー発生機序の解明に向けた線維化心筋組織における興奮伝播特性の評価
3. 学会等名 電気学会マグネティックス・医用生体工学合同研究会
4. 発表年 2020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