

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月12日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009年度～2012年度

課題番号：21340120

研究課題名（和文） 曲率効果に起因する心筋細胞でのラセン波形成機構

研究課題名（英文） Spiral Formation of Excitation Waves Based on Curvature Effect in Culture of Cardiomyocyte

研究代表者 アグラゼ コンスタンチン

（京都大学・物質－細胞統合システム拠点・教授）

研究者番号：30503651

研究成果の概要（和文）：

培養した心筋細胞を用い、特に障害領域を興奮波が通過する際の挙動について、実験ならびに理論の面から検討した。伝播の様式は細胞の興奮性に大きく依存し、興奮波の不安定化による自発的な端点形成も確認された。また、光感受性物質を混在させておくことによって外部からの光照射によって細胞活動を可逆的に制御したり、微細繊維を用いることで配向性の高い細胞培養手法を確立したりすることを可能とした。

研究成果の概要（英文）：

Behaviors of traveling excitation waves around obstacle region in cultivated cardiomyocytes were investigated in experimentally and numerically. The instability of propagation waves were affected by excitability of the cells and shape of obstacle. Spontaneous formation of spiral wave at edge of sharp corner was also observed. Furthermore, new methods (1) to control activity of cardiomyocytes with the aid of photo-switching molecules, and (2) to construct aligned culture of cells along fabricated microfiber were established.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2012年度	2,200,000	660,000	2,860,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学・生物物理－化学物理

キーワード：非線形振動、興奮性、曲率効果、心筋細胞、ラセン波、反応拡散方程式、パターン形成、光制御

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

刺激興奮性を示す系で生じる興奮波は、通常、開始点から等方的に伝播する。しかし、伝播する興奮波が何らかの影響によって寸断されると、その断端を中心として興奮波はラセン状となる。このようなラセン状興奮波の存在は、理論的に予測され、神経系・網膜・アメーバ集団・卵細胞表面・自己触媒過程を含む化学反応系など、生体系だけでなく非生体系においても現実には生じることが確認され、理論的解析も進んでいる。

心臓組織では空間的に伝播する興奮波（この場合は活動電位の伝播）によって心筋が収縮し、ポンプとしての役割を果たすが、心臓においてもラセン波が形成されることが分かってきた。

多くの場合、例えば心臓組織に損傷がある部分を興奮波が通過するなどし、興奮波の伝播が部分的に分断されると、その部分を中心としてラセン状のパターンが観察される。このようなラセン状の興奮波が発生すると心筋細胞の興奮が時間的・空間的に不規則になるため、不整脈などの心機能の低下が生じると考えられている。申請者は、このような心臓組織の損傷によって刺激としての興奮波の伝播に不均一性が生じ、その結果としてリエントリー状態が生じることを以前から指摘しており、最近、実験的にも示された。しかしながら、実際の心臓組織におけるラセン波の形成機構とそのダイナミクスについては未解明な部分が多く残っており、そのため、治療や予防対策が進んでいるとは言いがたい。本申請では、心筋細胞での刺激興奮波が示すダイナミクス、特に【曲率効果に着目したラセン波の形成機構の解明】について検討しようとするものである。

2. 研究の目的

この研究目的のため、『興奮波の曲率効果』に着目して研究を進めることとした。

興奮波は、通常、興奮波の形状に依存して伝播の様子が変化することが知られている。例えば、興奮波が伝播していく際、その曲率が大きくなると伝播速度が下がり、臨界値を越えると消滅するなどである。この状態は、興奮場の形状や興奮性、振動周期によっても変化していく。申請者は、この興奮波の持つ特性に着目し、心筋細胞を興奮場として捉え、物理的・化学的要因によって興奮を制御することで、興奮波の断端形成によるラセン波の発生の機構を探ろうとするものである。

本申請課題では、下記の事柄を相互に関連させ、実験と理論の両面からラセン波の形成

について検討した。

(1) 「ゲート」を用いた興奮波の曲率効果：

興奮波は、正の曲率（進行方向について凸型になる）が大きくなると興奮波の伝播速度が遅くなり、曲率がある閾値を超えると伝播しなくなる。興奮性を示す系において、様々な興奮波の曲率効果が知られているが、心筋細胞で生じる興奮波についての曲率効果については未解明な部分が多い。このため、興奮波の形状と伝播速度の相関性について実験的に調べ、理論的な考察を行う。簡単な系として、興奮波が「ゲート」のギャップを通過する際に曲率が変化することを利用し、曲率と伝播との相関について検討したい。心筋細胞における興奮波の曲率半径の臨界値を求めると共に、興奮波の分断とラセン波形成に関する基礎的知見を得る。

(2) 薬剤等による興奮性の制御：

興奮波の伝播は、興奮場の興奮性に依って変化する。障害物周辺で曲率が増大した時、細胞の興奮性が高ければ興奮波の伝播が継続し、低い状態では伝播が抑制されるため、断端が生じてラセン波が形成されることが他の実験系から推測できる。興奮性がさらに低くなった場合には興奮波は消滅すると考えられる。このように、臨界曲率半径は興奮性に依存して変化するため、「抗不整脈剤」など様々な化学種を用いて心筋細胞の興奮性を調節し、その状態における臨界値を求めると、興奮波のダイナミクスについて研究する。不整脈の薬物治療に関しては、『いかにして細胞に興奮性を持たせたまま、生じたラセン波を消去するか』が重要である。この問題に関して、本申請課題では薬物の濃度に依存した細胞の興奮性や興奮波のダイナミクスを直接的に観察できることから、薬剤効果の基礎データを得ることも目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、主として、新生児ラットの心筋細胞を用いた。ラット個体より摘出した心臓をコラゲナーゼ処理することによって心筋細胞を回収した後、フィブロネクチンでコートしたガラス基板上に播種して培養した。通常は、3～5日間程度培養することで、ガラス基板上で等方的な心筋細胞層が得られる。このようにして培養した細胞においては、活動電位が発生した後、それに続いてカルシウムの濃度変化が生じ、これらの「興奮波」が伝播していく。本研究では、細胞毒性や S/N 比の面から、主として Ca 感受性蛍光色素と膜電位感受性蛍光色素を用い、高感度蛍光頭

顕微鏡によって興奮波を可視化することとした。なお、興奮波の誘起には電気刺激などを与えることによって可能である。

興奮性の阻害には、物理的な方法と、化学的な方法を行った。

物理的な阻害としては、主として、培養した細胞の部分的な除去により、基板上で細胞が存在しない領域を意図的にデザインすることとした。この方法により、興奮波の通過する領域を狭めた「ゲート」や、鋭角に旋回させる場を軽視することが可能である。

また、化学的な阻害方法としては、興奮波の細胞間での伝播に重要な寄与を与えるギャップ結合の脱共役剤や、活動電位を引き起こす Na⁺ チャンネルの阻害剤であるヘプタノールやリドカイン、その他、様々な抗不整脈薬を用いる方法をとった。この化学的な阻害を用いた場合には、阻害剤の濃度によって全体的な興奮状態の変更が可能であることから、興奮波の伝播速度の調節に用いることが可能である。また、物理的な阻害と異なり、化学物質の拡散に伴う濃度低下によって興奮性の回復という、可逆的な効果も期待できる。

実験には、これら二種類の阻害方法を効果的に組み合わせ、伝播領域や伝播速度など、反応場をデザインすることによって興奮波の示すダイナミクスについて検討した。

4. 研究成果

(1) 興奮性の調節と興奮波のギャップ領域の通過

興奮波が隙間や障壁を通過する際の伝播の挙動を可視化した。ここで、細胞の興奮性は、イオンチャンネル阻害剤を添加することで調節し、ギャップのサイズや刺激周期との関連を調べた。これらの実験結果を数値計算結果と比較することで、伝播の挙動を明らかにした。(J. Exp. Theor. Phys. Lett., 2011)

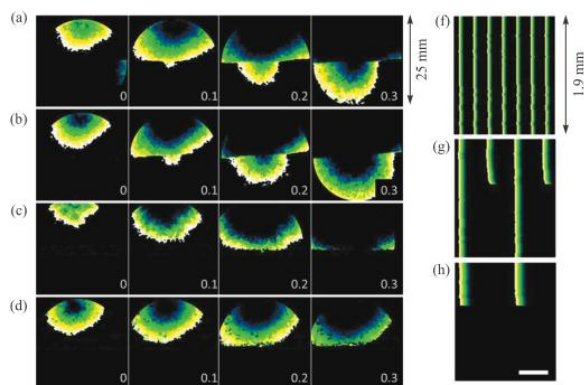


図1 培養心筋細胞においてギャップを通過する興奮波の挙動の例。サイズや興奮性を変えることで、伝播がブロックされたり、間欠的に通過する挙動がみられた。

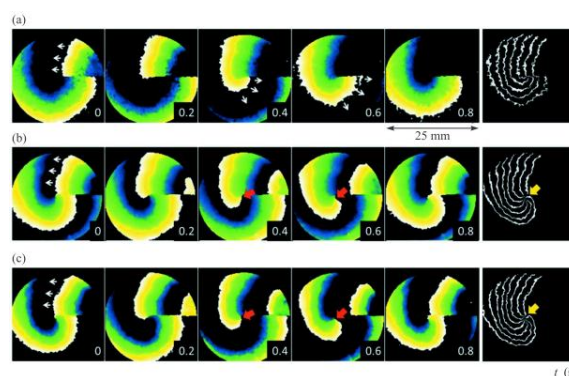


図2 障壁を鋭角的に旋回する興奮波の例

(2) 光感受性物質による興奮性の可逆的制御

光感受性物質を細胞外液に添加しておくことにより、その構造が照射する光の波長によって可逆的に変化することに対応して、細胞の収縮活動も可逆的に変化することを見出した。このことにより、照射する光の波長や領域を適切に選択することで、任意の領域の細胞活動を、非接触で制御できることを示した。(J. Exp. Theor. Phys. Lett., 2011; Tissue Engineering, 2011; Physica D, 2010)

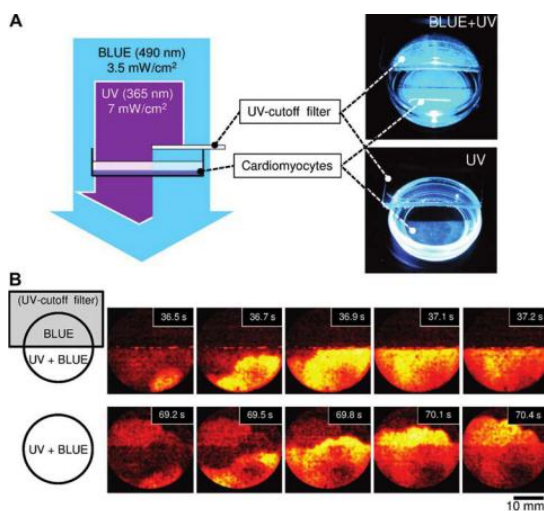


図3 光感受性物質を混在させた場合で観察される興奮波の伝播。興奮波は紫外線下で生じ、可視光下では阻害されることを示した。

(3) 培養細胞の伸展方向の制御

細胞を培養する際に、足場として、方向性の揃った微細繊維を用いることで、細胞は繊維方向に沿って成長していくことを見出した。このような高い配向性を有する組織においては、興奮波の伝播方向に異方性が生じ、構造だけでなく、性質的にも実際の筋肉組織と同様であることを示した。(Biomaterials, 2011)

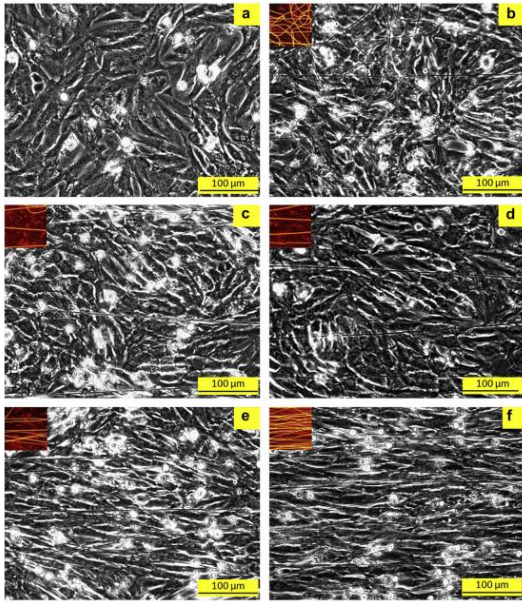


図4 微細繊維上で培養した心筋細胞。細胞は繊維に沿って成長するため、あらかじめ繊維の方向を揃えておくことにより、非常に高い配向性を有する細胞が得られた。

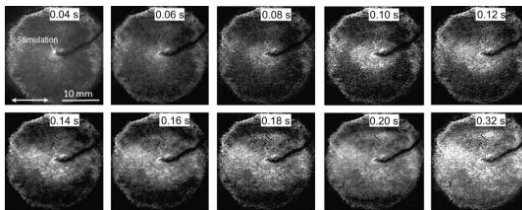


図5 高配向細胞での興奮波の伝播。興奮波の伝播速度は細胞の伸展方向に依存し、異方性のある伝播となることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- 1) L. Wang, L. Liu, X. Li, N. Magome, K. Agladze, and Y. Chen, "Multi-electrode monitoring of guided excitation in patterned cardiomyocytes", *Microelectron. Eng.*, in press.
- 2) S. Kadota, I. Minami, N. Morone, J. E. Heuser, K. Agladze, and N. Nakatsuji, "Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem

cell-derived cardiac cell sheets", *Eur. Heart J.*, vol.34 pp.1147-1156 (2013), doi: 10.1093/eurheartj/ehs418

- 3) S. Kadota, M. W. Kay, N. Magome, and K. Agladze, "Curvature-dependent excitation propagation in cultured cardiac tissue", *J. Exp. Theor. Phys. Lett.*, vol.94, pp.838-844 (2011).
- 4) I.S.Erofeev, N. Magome, and K. Agladze, "Digital photo-control of the network of live excitable cells", *J. Exp. Theor. Phys. Lett.*, vol.94, pp.513-516 (2011).
- 5) N. Magome, G. Kanaporis, N. Moisan, K. Tanaka, and K. Agladze, "Photo-Control of Excitation Waves in Cardiomyocyte Tissue Culture", *Tissue Engineering part A*, vol.17, pp.2703-2711 (2011).
- 6) Y. Orlova, N. Magome, L. Liu, Y. Chen, and K. Agladze, "Electrospun nanofibers as a tool for architecture control in engineered cardiac tissue", *Biomaterials*, vol.32, pp.5615-5624 (2011).
- 7) N. Magome and K. Agladze, "Patterning and excitability control in cardiomyocyte tissue culture", *Physica D*, vol.239, pp.1560-1566 (2010).

[学会発表] (計13件)

代表的なものとして、下記の4点を挙げる。

- 1) K. Agladze, "Photo-controlled engineered cardiac tissue", International Conference "Instabilities and Control of Excitable Networks: From macro- to nano-systems" 2012年5月, Dolgoprudny, Russia.
- 2) N. Magome, Y. Orlova, L. Liu, Y. Chen, and K. Agladze, "Control of Structure and Excitability of Cardiomyocyte Culture", International Symposium on Engineering Neo-Biomimetics II & Soft nanomaterials and Soft Robotics -, 2011年2月, Tsukuba.
- 3) N. Magome, L. Swift, H. Asfour, M. Kay, N. Sarvazyan, and K. Agladze, "Light Mediated Control of Cardiac Excitability", 55th Annual Meeting of the Biophysical Society, 2011年3月, Maryland, USA.
- 4) N. Magome and K. Agladze, "Optical Control of Excitation Waves in Cardiomyocyte Culture", Gordon Research Conference; Oscillation & Dynamic

Instabilities in Chemical Systems, 2010 年
7 月, Lucca, Italy.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

<http://www.agladze.icems.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

アグラゼ コンスタンチン

(AGLADZE KONSTANTIN)

京都大学・物質－細胞統合システム拠点・
教授

研究者番号：30503651

(2) 研究分担者

馬籠 信之 (MAGOME NOBUYUKI)

(平成 21 年度～平成 23 年度)

京都大学・物質－細胞統合システム拠点・
助教

研究者番号：70390052

元池 育子 (MOTOIKE IKUKO)

(平成 21 年度～平成 22 年度)

京都大学・物質－細胞統合システム拠点・
研究員

研究者番号：70347178

今村 寿子 (IMAMURA HISAKO)

(平成 22 年度)

京都大学・物質－細胞統合システム拠点・
研究員

研究者番号：30523790

オルロバ ユリヤ

(ORLOVA YULIYA)

(平成 23 年度～24 年度)

京都大学・物質－細胞統合システム拠点・
研究員

研究者番号：90571901

(3) 連携研究者

なし