

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：32675

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650253

研究課題名(和文) 拍動心筋細胞を用いた後天的情報の獲得保持機構の解明

研究課題名(英文) Clarify the acquisition and retention mechanisms of epigenetic information by use of beating cardiomyocytes

研究代表者

金子 智行 (KANEKO, Tomoyuki)

法政大学・生命科学部・教授

研究者番号：90345067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内に蓄えられた後天的情報を定量化するために、モデル細胞として拍動心筋細胞を用い、細胞に摂動を与えたときの緩和過程を測定した。まず、外部から摂動を与えるための電気刺激プロトコルを改良することにより拍動周期の制御を可能にし、心筋細胞の拍動周期と細胞外電位を同時測定する系を確立した。次に、電気刺激により拍動周期を固定すると、イオンチャネルの活動状態がその周期に依存して対数関数的に変化した。このことから拍動周期という後天的情報の表現型は後天的情報であるイオンチャネルの活動状態を変化させ、拍動周期と関連した活動状態まで対数関数的に変化することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To quantify the epigenetic information accumulated in cells, I observed the relaxation process after adding perturbations to beating cardiomyocytes for model cells. First, I developed the system of simultaneous measurement of beating rate and field potential in beating cardiomyocytes for measurement of correlation between beating rate and active state of ion channels. Next, I measured the active state of ion channels and the beating rate on cardiomyocytes adding to perturbation for electrical stimulation, drug effects, and temperature changes. As a result, active state of ion channels was logarithmically changed by the beating rate fixed with electrical stimulation, and at the stopping of electrical stimulation it was logarithmically reverted to the active state before adding perturbation. Finally, these results were clarified a part of acquisition and retention mechanism of epigenetic information by analysis of relaxation process after perturbations.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：心筋細胞 細胞外電位計測 拍動周期 後天的情報

1. 研究開始当初の背景

細胞内に蓄えられている情報には先天的情報と後天的情報の二種類が存在している。先天的情報については DNA などに代表される遺伝情報があり、ヒトゲノム解析などにより研究が進んでいる。しかし、後天的情報は外部の環境変化により獲得された情報であり、細胞レベルでの研究は進んでいなかった。

2. 研究の目的

細胞内に蓄えられた後天的情報を定量化するために、モデル細胞として拍動心筋細胞を用い、拍動リズムとイオンチャンネルの機能を同時計測する系を確立する。この系を用いて、細胞に摂動を与えたときの緩和過程を観察することにより、後天的情報の定量化を行うのが目的である。

3. 研究の方法

後天的情報の定量化のために、拍動心筋細胞をモデル細胞として、拍動時のイオンチャンネルの活性化状態を細胞外電位から推測し、拍動周期とイオンチャンネルの活性化状態の相関をとることを試みた。

そのためにまず、心筋細胞の拍動と細胞外電位を同時測定する系を確立し、外部から摂動を与えるための電気刺激プロトコルを改良し、拍動周期の制御を可能にした。次に、電気刺激や薬剤、温度変化等の様々な摂動を与えた際の変化量を拍動周期と、その元になっているイオンチャンネルの機能的発現量を計測した。最後に、それらの変化量の相関をとることにより、後天的情報の獲得・保持機構の解明を試みた。

4. 研究成果

(1) モデル細胞である心筋細胞の拍動と細胞外電位を同時に計測する系の確立。

一般的には、細胞の電位を計測するにはパッチクランプ法が用いられるが、非侵襲的で長期的な測定には不向きである。そこで、非侵襲で長期的に計測可能な細胞外電位計測法と位相差顕微鏡法を組み合わせ、モデル細胞である心筋細胞を培養しながら計測するシステムを構築した(図 1)。このシステムを用いて、心筋細胞の拍動を位相差顕微鏡で測定し、同時に細胞外電位を計測することにより、拍動と細胞膜上のイオンチャンネルの活動測定が可能となった。まず、拍動の解析性能を評価するために、心筋 1 細胞の形状と拍動の強さや方向の関係性を測定したところ、円形的心筋細胞に比べて、長方形的心筋細胞は長軸に沿って拍動する傾向が強いことがわかった(図 2)。今後、拍動の方向性とイオンチャンネルの活動状況についても解析を行っていく予定である。

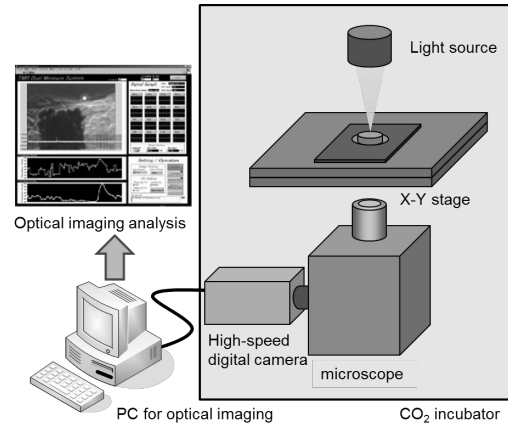


図 1 細胞しながら拍動と細胞外電位を同時計測するシステムの模式図

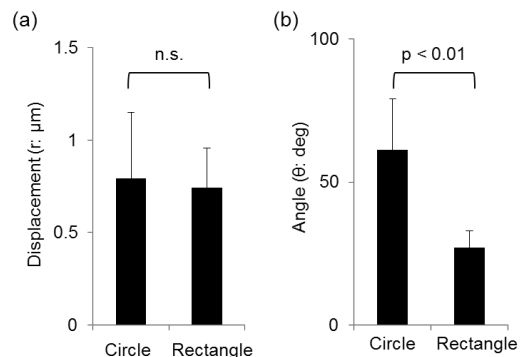


図 2 円形と長方形の心筋細胞の拍動の強さと方向性の関係

(2) 心筋細胞に摂動を与えるための電気刺激プロトコルの改良。

心筋細胞の拍動周期は様々な要因によって決定されている。しかし、電気刺激によって、その周期は制御することが可能であることが知られている。そこで、細胞外電位を測定しながら、電気刺激により拍動周期を変化させたときのイオンチャンネルの活動状態を測定することができれば、拍動周期とイオンチャンネルの活性化状態の相関がとれると考えた。しかし、通常の電気刺激では、印加時に巨大な電位変化と緩和過程(アーティファクト)があり、小さな細胞外の電位変化はかき消されてしまった。そこで、電気刺激のプロトコルを見直し、アーティファクトの小さい方法を探索した。今までの刺激プロトコルでは、1回の矩形波をプラス、マイナスで連続して与えるものであったが、私は複数回の矩形波をプラス数回、マイナス数回に分けて与え、そのバランスによって一番アーティファクトの小さい刺激プロトコルを探索した(図 3)。これにより、心筋細胞の細胞

外電位よりも小さいアーティファクトしか発生しない刺激プロトコルを見つけることに成功した。

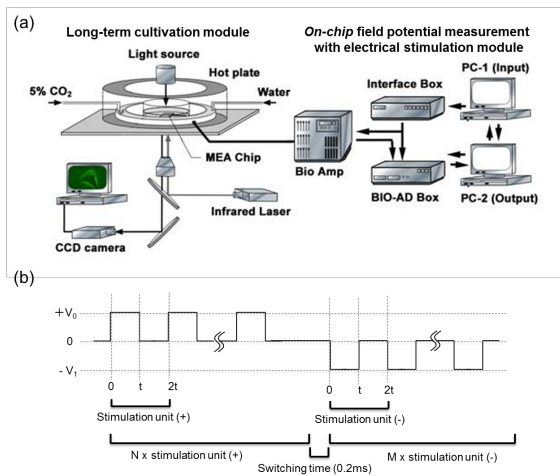


図3 電気刺激可能な細胞外電位計測システムと改良した電気刺激プロトコル

(3) 電気刺激による心筋細胞の拍動周期変化とイオンチャネルの活性化状態の計測。

アーティファクトの小さい電気刺激が可能になったことで、心筋細胞を一定の周期で拍動させた時の細胞外電位の測定が可能となった。そこで、拍動周期と細胞外電位の相関関係の解析を試みた。電気刺激により、心筋細胞の拍動周期を変化させると、すぐにその拍動周期に追従し、電気刺激を止めると、すぐに刺激前の元の周期に戻ることがわかった。そのとき、細胞外電位のマイナスピーク(Na⁺電位)とプラスピーク(K⁺電位)の間隔である細胞外電位持続時間(FPD)は、すぐに追従せず、対数関数的に徐々に追従し、電気刺激を止めたときも、対数関数的に徐々に元の値に戻っていくことがわかった(図4)。このことから、心筋細胞の拍動周期の変化はイオンチャネルの活動状態の変化をもたらすが、その変化は急激には起こらず、対数関数的に徐々に変化していくことが示唆された。

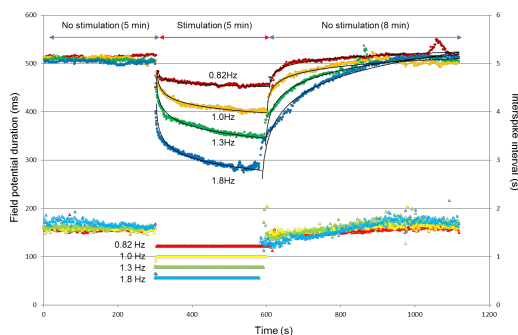


図4 電気刺激による拍動周期と細胞外持続時間(FPD)の変化

(4) 薬剤による心筋細胞イオンチャネルの阻害と拍動周期変化の計測。

薬剤による心筋細胞の応答変化(FPDの延長等)はドラッグスクリーニングの分野で重要となっている。しかし、薬剤によるイオンチャネルの阻害はFPDの変化だけではなく、細胞周期の変化も引き起こし、正確なFPDの変化を測定することができなかった。そこで、前述の改良した電気刺激プロトコルを用いることにより、電気刺激により拍動周期を1Hzで固定したときの薬剤の応答を計測した(図5)。その結果、FPDが延長することが知られている薬剤E-4031でFPDの延長を確認することができた(図5c)。これにより、一定の拍動周期における薬剤の影響を調べることが可能となった。今後は、一定拍動周期下でのイオンチャネル阻害剤とイオンチャネルの活性状態や、阻害剤による拍動周期変化を解析することにより、細胞内に蓄えられた後天的情報について解明していく予定である。

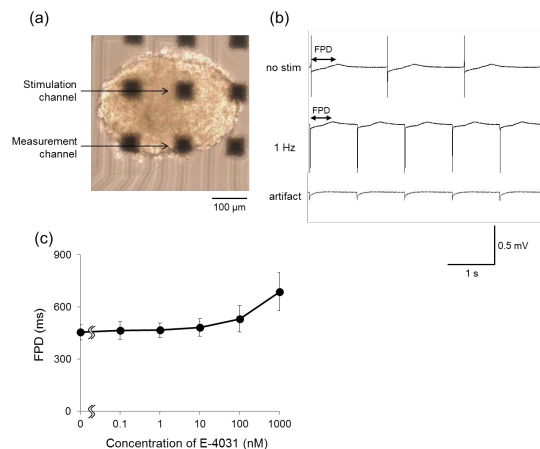


図5 電気刺激による心筋細胞の拍動周期の固定と薬剤による応答性の測定

(5) 温度変化による心筋細胞の拍動周期変化の計測。

心筋細胞は温度が上昇すると拍動周期が速くなり、温度が低下すると遅くなるのが知られている。しかし、それらの温度変化とイオンチャネルの活動状態の変化についてはよくわかっていない。そこで、細胞外電位を記録しながら、温度を変化させることにより、温度変化による拍動周期の変化とイオンチャネルの活動状態の変化を同時記録した。その結果、温度変化により拍動周期が変化するに伴って、イオンチャネルの活動状態は変化した。現在、この変化について解析中である。本研究は法政大学に異動してからの研究であり、動物実験の制限から、ニワトリ胚由来心筋細胞を用いた。今後はニワトリ胚を用いることになるが、薬剤の応答性や温度変化への応答性はヒトやマウスの心筋細胞と同等の変化が観察されている。将来的にはヒト

由来心筋細胞の代換としての利用が期待できる。

(6) 後天的情報の獲得・保持機構の解明に迫る。

最後に、これまでの研究成果を統合して、後天的情報の獲得・保持機構について考察する。拍動周期に関しては、電気刺激、温度変化により、自在に変化させることを可能にした。電気刺激により拍動周期を固定すると、イオンチャネルの活動状態がその周期に依存して変化した。イオンチャネルの活動状態は拍動周期という表現型となる後天的情報としてとらえることができるが、逆に拍動周期を強制的に変化させることにより、後天的情報であるイオンチャネルの活動状態が変化することを発見した。このイオンチャネルの活動状態は拍動周期と関連した活動状態まで対数関数的に変化することが示唆された。これにより、細胞の後天的情報の獲得・保持機構の一端が明らかとなった。

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 8 件)

T. Hamada, T. Kaneko, F. Nomura, K. Yasuda, "Physiological Sample Uniformity and Time-Course Stability in Lined-Up Structure of Human Cardiomyocyte Network for In vitro Predictive Drug-Induced Cardiotoxicity," Jpn. J. Appl. Phys., 52: 06GK05 (2013) 査読有
DOI:10.7567/JJAP.52.06GK05

T. Kaneko, E. Takizawa, F. Nomura, T. Hamada, A. Hattori, K. Yasuda, "On-Chip Single-Cell-Shape Control Technology for Understanding Contractile Motion of Cardiomyocytes Measured Using Optical Image Analysis System," Jpn. J. Appl. Phys., 52: 06GK06 (2013) 査読有
DOI:10.7567/JJAP.52.06GK06

F. Nomura, T. Kaneko, T. Hamada, A. Hattori, K. Yasuda, "Advanced Ring-Shaped Microelectrode Assay Combined with Small Rectangular Electrode for Quasi-In vivo Measurement of Cell-to-Cell Conductance in Cardiomyocyte Network," Jpn. J. Appl. Phys., 52: 06GK07 (2013) 査読有
DOI:10.7567/JJAP.52.06GK07

H. Hamada, F. Nomura, T. Kaneko, K. Yasuda, M. Okamoto, "Exploring the implicit interlayer regulatory mechanism between cells and tissue: Stochastic

mathematical analyses of the spontaneous ordering in beating synchronization," Biosystems, 111:208-215 (2013) 査読有
DOI:10.1016/j.biosystems.2013.02.007

T. Kaneko, F. Nomura, A. Hattori, K. Yasuda, "Improvement of Electrical Stimulation Protocol for Simultaneous Measurement of Extracellular Potential with On-Chip Multi-Electrode Array System," Jpn. J. Appl. Phys., 51: 06FK02 (2012) 査読有
DOI:10.1143/JJAP.51.06FK02

T. Hamada, F. Nomura, T. Kaneko, K. Yasuda, "Importance of Thickness in Human Cardiomyocyte Network for Effective Electrophysiological Stimulation Using On-Chip Extracellular Microelectrodes," Jpn. J. Appl. Phys., 51: 06FK03 (2012) 査読有
DOI:10.1143/JJAP.51.06FK03

F. Nomura, T. Kaneko, T. Hamada, A. Hattori, K. Yasuda, "Quantitative Evaluation of Closed-Loop-Shaped Cardiomyocyte Network by Using Ring-Shaped Electrode," Jpn. J. Appl. Phys., 51: 06FK06 (2012) 査読有
DOI: 10.1143/JJAP.51.06FK06

安田賢二、金子智行、野村典正、幹細胞の創薬応用を目指したオンチップ・テクノロジー、ファルマシア、48, 823-825 (2012) 査読無
<http://farumashia.pharm.or.jp/mokuji/2012/48-09.html>

[学会発表](計 22 件)

T. Kaneko, F. Nomura, T. Hamada, A. Hattori, K. Yasuda, "On-chip optical image analysis system combined with on-chip single-cell-shape control technology for measurement of contractile direction and displacement on single cardiomyocytes," 1810, The American Society for Cell Biology 2013 Annual Meeting (2013 年 12 月 14 日 ~ 18 日, New Orleans, USA)

T. Kaneko, F. Nomura, T. Hamada, A. Hattori, K. Yasuda, "Measurement of contractile direction on single-shape-controlled cardiomyocytes by on-chip optical image analysis system," 2P287, 第 51 回日本生物物理学会年会 (2013 年 10 月 28 日 ~ 30 日, 国立京都国際会館)

T. Kaneko, F. Nomura, T. Hamada, A.

Hattori, K. Yasuda, "Simultaneous dual measurement of mechanical responses and electrophysiological properties of cardiomyocytes using on-chip optical image analysis and field potential recording system," Pos-L3853, 57th Annual Meeting of Biophysical Society (2013年2月2日~6日, Philadelphia, USA)

F. Nomura, T. Kaneko, T. Hamada, K. Yasuda, "Evaluation of On-chip quasi-in vivo cardiac toxicity assay for direct prediction of TdP occurrence using closed-loop-shaped cardiomyocyte network," 1462-Pos, 57th Annual Meeting of Biophysical Society (2013年2月2日~6日, Philadelphia, USA)

T. Kaneko, F. Nomura, T. Hamada, A. Hattori, K. Yasuda, "Long-term simultaneous dual measurement of electrophysiological properties and mechanical responses of cardiomyocytes using on-chip extracellular field potential recording and real-time optical image analysis," No.1719, The American Society for Cell Biology 2012 Annual Meeting (2012年12月15日~19日, San Francisco, USA)

H. Terazono, H. Kim, A. Hattori, F. Nomura, T. Kaneko, K. Yasuda, "Non-invasive/destructive single cell purification method for re-cultivation of functionally identified specific cells using spot digestion of double alginate sol layers on a multielectrode array chip," No.926, The American Society for Cell Biology 2012 Annual Meeting (2012年12月15日~19日, San Francisco, USA)

T. Kaneko, F. Nomura, T. Hamada, A. Hattori, K. Yasuda, "Development of On-Chip Dual Measurement System for Cardiac Contraction Fluctuation Assay using Simultaneous Recording of Extracellular Field Potential and Optical Image," 1P-7-93, 25th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2012) (2012年10月30日~11月2日, 神戸メリケンパークオリエンタルホテル)

F. Nomura, T. Kaneko, A. Hattori, K. Yasuda, "Quantitative Evaluation of Quasi-electrocardiogram Measurement for Direct Prediction of Lethal Arrhythmic Beating Occurrence using Ring-shaped Cardiomyocyte Network with Ring Electrode Array," 1P-7-95, 25th International

Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2012) (2012年10月30日~11月2日, 神戸メリケンパークオリエンタルホテル)

T. Hamada, F. Nomura, T. Kaneko, K. Yasuda, "Temporalspatial External Field Potential Fluctuation Measurement in Constructive Cardiomyocyte Network for in Vitro Predictive Cardiotoxicity," 1B-4-2, 25th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2012) (2012年10月30日~11月2日, 神戸メリケンパークオリエンタルホテル)

A. Hattori, T. Kaneko, F. Nomura, K. Yasuda, "Surface Roughness of Cells as Index of Label-free Cell Identification and Separation in On-chip Imaging Cell Sorting System," 1P-7-85, 25th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2012) (2012年10月30日~11月2日, 神戸メリケンパークオリエンタルホテル)

K. Yasuda, F. Nomura, T. Hamada, T. Kaneko, H. Takamori, Y. Abe, T. Sakakura, K. Takasuna, A. Sanbuissho, "Toward quasi-in vivo from in vitro assay (I). On-chip cardiomyocyte network screening assay for predictive cardiotoxicity," No.088, Safety Pharmacology Society 12th Annual Meeting (2012年10月1日~4日, Phoenix, USA)

T. Kaneko, F. Nomura, T. Hamada, A. Hattori, K. Yasuda, "Toward Quasi-in vivo from in vitro assay (II). Development of on-chip predictive cardiotoxicity assay for cardiac contraction fluctuation measurement using dual recording of electrical field potential and optical image analysis," No.089, Safety Pharmacology Society 12th Annual Meeting (2012年10月1日~4日, Phoenix, USA)

T. Hamada, F. Nomura, T. Kaneko, H. Takamori, Y. Abe, T. Sakakura, K. Takasuna, A. Sanbuissho, K. Yasuda, "Toward Quasi-In Vivo from In Vitro assay (III). Evaluation of Temporal Field Potential Duration Fluctuation and Spatial Conduction Velocity Fluctuation of Cardiomyocyte Network for In Vitro Predictive Cardiotoxicity Measurement," No.090, Safety Pharmacology Society 12th Annual Meeting (2012年10月1日~4日, Phoenix, USA)

F. Nomura, T. Kaneko, T. Hamada, K.

Yasuda, "Toward quasi-in vivo from in vitro assay (IV). Quasi-electrocardiogram measurement for direct prediction of TdP occurrence using ring-shaped cardiomyocyte network with ring electrode array," No.091, Safety Pharmacology Society 12th Annual Meeting (2012年10月1日~4日、Phoenix, USA)

H. Terazono, H. Kim, F. Nomura, T. Kaneko, T. Hamada, K. Yasuda, "Toward quasi-in vivo from in vitro assay (V). Non-invasive precise purification of ventricular cells from mixture of differentiated human stem cell derived cardiomyocytes using spot digestion of double alginate layers on a multi-electrode array chip," No.092, Safety Pharmacology Society 12th Annual Meeting (2012年10月1日~4日、Phoenix, USA)

Y. Abe, T. Sakakura, K. Takasuna, A. Sanbuissho, F. Nomura, T. Hamada, T. Kaneko, K. Yasuda, "Evaluation of ion channel trafficking of human stem cell derived cardiomyocytes for cardiotoxicity screening," No.022, Safety Pharmacology Society 12th Annual Meeting (2012年10月1日~4日、Phoenix, USA)

T. Shoji, T. Kaneko, F. Nomura, A. Hattori, K. Yasuda, "Development of Dual Recording Assay for Cardiac Function Measurement using Electrical Field Potential and Optical Image Analysis," 3PS023, 第50回日本生物物理学会年会 (2012年9月22日~24日、名古屋大学)

A. Hattori, T. Kaneko, F. Nomura, K. Yasuda, "Quantitative evaluation of cell separation method based on shape recognition using on-chip imaging cell sorter," 3PS049, 第50回日本生物物理学会年会 (2012年9月22日~24日、名古屋大学)

H. Terazono, H. Kim, A. Hattori, F. Nomura, T. Kaneko, K. Yasuda, "A Non-destructive Culturing and Cell Sorting Method for Cardiomyocytes and Neurons Using an Alginate Layer," 3PS046, 第50回日本生物物理学会年会 (2012年9月22日~24日、名古屋大学)

T. Kaneko, F. Nomura, K. Yasuda, "Optimization of effective electrical stimulation protocol for cardiomyocyte beating interval control in extracellular potential measurement assay in predictive cardiotoxicity testing," 3PS020, 第50

回日本生物物理学会年会 (2012年9月22日~24日、名古屋大学)

② F. Nomura, T. Kaneko, T. Hamada, K. Yasuda, "On-chip quasi-in vivo cardiac toxicity assay using ring-shaped closed circuit microelectrode with lined-up cardiomyocyte network," 3PS022, 第50回日本生物物理学会年会 (2012年9月22日~24日、名古屋大学)

② T. Hamada, F. Nomura, T. Kaneko, K. Yasuda, "Evaluation of temporal fluctuation and spatial fluctuation on cardiomyocyte network for in vitro predictive cardiotoxicity measurement," 2D1510, 第50回日本生物物理学会年会 (2012年9月22日~24日、名古屋大学)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 智行 (KANEKO, Tomoyuki)
法政大学・生命科学部・教授
研究者番号：90345067

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：