

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25410162

研究課題名(和文)電気化学顕微鏡を用いた心筋細胞解析技術の開発

研究課題名(英文) Analysis of beat fluctuations in cardiomyocytes by scanning electrochemical microscopy

研究代表者

平野 悠 (Hirano, Yu)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：70415735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：創薬において、新規薬剤候補の心臓へ与える影響を評価するためには、心筋細胞を利用して拍動パターンの解析が必須となっている。本研究では、生細胞を対象に、非接触かつ多機能な観察が可能である走査型電気化学顕微鏡(SECM)を利用して、心筋細胞の動きやエネルギー代謝を一細胞レベルで解析可能なシステムを開発した。特に、SECMのプローブであるマイクロ電極先端に、DNA足場として二種類の酵素を固定化することで局所におけるグルコース濃度測定を実現し、細胞レベルでのグルコース消費評価の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Analysis of cardiac action potential is currently used to evaluate the pharmacological and toxicological properties of drugs. In this study, we developed a SECM system for analyzing contraction kinetics and energy metabolisms in cardiomyocytes. To analyze a glucose consumption in living cells, multiple enzymes were immobilized on a microelectrode surface by attachment at the termini of various double strands DNA. The enzyme immobilized microelectrode could be used for imaging glucose distributed in a local area.

研究分野：生物電気化学

キーワード：電気化学 走査型電気化学顕微鏡 心筋細胞 一細胞分析 マイクロ電極

1. 研究開始当初の背景

心臓は規則的に収縮し全身に血液を循環することで生命を維持している。そのため、心臓に対する生理活性物質の薬理作用や毒性の評価は極めて重要である。特に、薬剤の副作用として、主薬効に関係無く心臓の活動電位持続時間の延長(QT 延長)を引き起こすことがあり、心臓の拍動に薬剤が与える影響を評価する安全性試験は創薬に欠かせないものとなっている。心臓に対する毒性や薬理作用は、心筋細胞もしくはイオンチャンネルを発現させたモデル細胞を対象に、アレイ電極基板やパッチクランプを用いて電位変化を記録して評価することが多い。特に、生体より取り出された初代心筋細胞は、生体臓器に近い機能を持つことから極めて有効である。しかしながら、心筋細胞以外の細胞を完全に取り除くことは難しく、定量的な評価ができない場合があった。また、細胞活性など拍動パターン以外を同時に解析することも難しくかった。

走査型電気化学顕微鏡 (SECM) はマイクロ電極をプローブとして、局所領域における電気化学反応を検出・誘起することが可能なシステムであり、細胞近傍の酸素濃度の検出をはじめ、細胞形状、膜透過性などの解析に活用した報告もなされている。さらに、プローブと細胞が数 μm 離れていても測定可能であるため、細胞に障害を与えることなく観察できる。ところが、プローブの位置や温度による誤差などを補正する技術が必要とされ、従来の SECM も他の細胞評価法と同じく連続して細胞を観察することは困難な場合があった。我々はこの問題点を解決するために、独自の自動化測定技術と、温度制御技術を開発し、一細胞を長時間連続して測定可能なシステムを開発してきた。一方、電極表面に酵素を固定化することで、グルコースなどを測定可能なセンサーが開発されている。これをマイクロ電極に応用することで、細胞が消費する生理活性物質などの定量が期待できるが、マイクロ電極は電極表面積が極めて小さいことから酵素の固定化が難しく、電流応答も小さいことから酵素固定化マイクロ電極はほとんど開発されてこなかった。

2. 研究の目的

初代心筋細胞中において、細胞を選択して評価できれば、夾雑細胞(心筋繊維芽細胞など)の影響を低減し、データの再現性の向上が期待できる。また、電気化学測定を利用することで同じサンプルを対象に拍動パターンだけではなく、酸素消費などの解析も期待できる。そこで、本研究では、心筋細胞の細胞動態を観察することを目的に、これまで開発してきた SECM システムとその周辺技術に改良を加えた新規な細胞評価技術と、その解析システムを開発する(図 1)。特に、細胞活性をより詳細に解析するために、酵素をマイクロ電極先端に選択的に固定化し、細胞レベ

ルでグルコースなどの生理活性物質の消費や産生を評価可能な技術の構築を目指す。



図1 SECMを利用した心筋細胞の評価

3. 研究の方法

心筋細胞の細胞動態を電気化学的に測定するために、培養環境を SECM 観察下で再現し、さらに心筋細胞に適した新たな細胞評価技術を確立する。初めに、一定間隔で拍動する心筋細胞の動きを対象とした評価系を開発する。ここでは、心筋細胞の直上に接触することなく高精度に電極を配置し、微小電流を高速サンプリングすることで拍動に伴う細胞形状変化を解析する。続いて、細胞レベルでグルコースなどの生理活性物質の消費や産生を評価するために、特定分子を定量可能なマイクロ電極を開発する。ここでは、マイクロ電極先端に選択的に複数の酵素を固定化して、電流応答で評価する。

(1) 心筋細胞の拍動パターンの解析

SECM のプローブであるマイクロ電極の電流値は対象との距離に依存する。特に、親水性の電気化学活性種(Med)を添加した溶液中では、細胞形状の変化を測定可能である。SECM を利用して、心筋細胞の薬剤添加時の応答を測定するために、心筋細胞の自律拍動を維持しつつ、Med 存在下で電気化学測定可能な培地を開発する。さらに、顕微鏡のステージ上で培養条件を維持するために、温度などを高精度に制御する機構を SECM システムに導入する。

心筋細胞の収縮・弛緩はイオンチャンネルの開閉が引き起こしている。従って収縮強度や収縮や弛緩時の速度を解析することで、イオンチャンネルと薬剤との相互作用を見積もり、毒性や薬理作用などを評価できる。ここでは、電流応答として得られた拍動パターンから、ピークを検出して拍動周期を解析し、さらに波形を平均化する解析ソフトウェアを開発する。この結果を利用して、収縮・弛緩速度と形状変化量(収縮強度)を計算する。

(2) 酵素固定化マイクロ電極の開発

心筋細胞では低酸素状態や薬剤の作用により TCA 回路が阻害されると嫌気性解糖により乳酸が生成して代謝性アシドーシスが誘導される。しかしながら、一細胞レベルでグルコースや乳酸などの代謝活性を測定することは極めて困難である。細胞近傍のグルコースなどの生理活性物質の濃度変化を測定することは、代謝活性の評価につながる。そこで、グルコースを測定可能な酵素センサー技術を用いて、マイクロ電極先端に DNA を足場として酵素を固定化することで、局所におけるグルコースを測定可能なマイクロ電極を開発する。

4. 研究成果

(1) 心筋細胞の拍動パターンの解析

心筋細胞の動きと酸素消費を同一細胞で評価可能なシステムを開発した。具体的には、細胞と同程度のサイズ(10 μm)の針状の Pt ディスク電極を作製し、細胞接着面と垂直方向に電極を走査しながら電流を記録するアプローチカーブ測定を利用して、細胞に触れることなく細胞直上 1 - 10 μm の位置に正確に配置するシステムを構築した。また、培養条件を含めて自律拍動するラット由来初代心筋細胞を評価するために最適化した。さらに、細胞近傍に配置した電極で観察される微小電流を高速サンプリングすることで、細胞の収縮、弛緩に伴う拍動パターンを電流応答としてリアルタイム測定した。同じ電極を利用して酸素の還元電流を測定することで、培養心筋細胞の細胞群を対象とした酸素消費速度を測定可能なシステムを開発した。

拍動の動きと酸素消費の測定を連続して行うことで、同一細胞群を対象として心筋細胞の拍動に伴う動きと酸素消費の評価が可能となった。開発したシステムを用いて、実際に使われている薬剤を添加した時の細胞動態を測定し、強心剤の薬理作用評価への応用が可能であることを示した。

(2) 酵素固定化マイクロ電極の開発

細胞レベルでグルコースなどの生理活性物質の消費や産生を評価するために、二種類の酵素をマイクロ電極表面に選択的に固定化した酵素固定化マイクロ電極を開発した。これまでも、電極表面に酵素を固定化することで、グルコースや乳酸濃度を測定可能なセンサーが開発されているが、マイクロ電極では電極表面積が極めて小さいことから酵素の固定化が難しく、電流応答も小さいことから細胞近傍の生理活性物質の濃度変化をリアルタイムで測定することは困難であった。一方、二種類の酵素の連続反応を利用すると酵素センサーのシグナルが向上することが報告されていた。そこで、DNA を酵素固定化の足場として利用することで、マイクロ電極先端に二種類の酵素を、位置や距離を制御して固定化し、連続反応を最適化する方法

を開発した(図 2)。

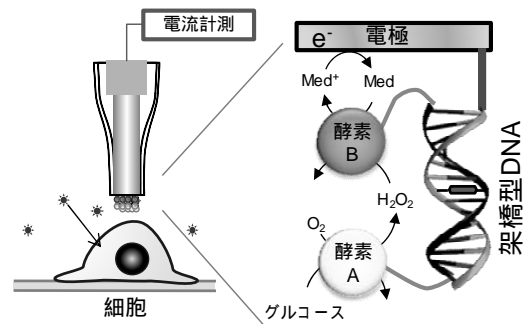


図2 架橋型DNAを利用したマイクロ電極表面への酵素の配列固定

酵素の固定化に DNA を足場として利用することで、酵素と電極表面との物理的接触を抑制して固定化状態を改善した(図 3、足場有・架橋無)。また、固定化状態を安定化するために、足場となる DNA として架橋型 DNA (引用文献) を利用した。DNA 二本鎖と同じ配列の架橋型 DNA を足場として酵素を固定化し、電流応答を比較すると、架橋型 DNA を足場として利用した電極で電流応答が増加した。このことから、架橋型 DNA が熱などによる変性を抑制して固定化状態を安定化していることが示された(図 3、架橋無・架橋有)。さらに、足場となる DNA 配列を変えることで、二種類の酵素の距離や電極との位置関係をナノスケールで制御し、二種類の酵素の連続する反応を最適化できることを示した(図 3、酵素配置を制御)。最適な足場 DNA を利用することでグルコース濃度の変化を電流応答としてリアルタイムで測定可能な酵素マイクロ電極を構築できた。

酵素固定化マイクロ電極と SECM を統合することで、グルコースの局所濃度変化のイメージングを実現し、細胞レベルでのグルコース消費の評価の可能性を示した。

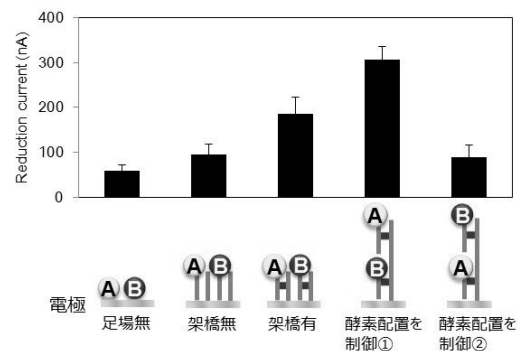


図3 DNAを足場とした酵素固定化電極のグルコースに対する電流応答

引用文献

“ Interstrand cross-link of DNA by covalently linking a pair of abasic sites. ” K Ichikawa, N. Kojima, Y. Hirano, T. Takebayashi, K. Kowata and Y. Komatsu, Chem. Commun., 48, 2143-2145, (2012).

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

“ Bienzyme reactions on cross-linked DNA scaffolds for electrochemical analysis. ” Hirano, Y., Ikegami, M., Kowata, K., and Komatsu, Y. Bioelectrochemistry., 113, 15-19 (2017). 査読有
DOI:10.1016/j.bioelechem.2016.08.005

“ Fabrication and characterization of nanoporous gold on microelectrode. ” Ikegami, M., Hirano, Y., Mie, Y., Komatsu, Y. Journal of Electroanalytical Chemistry., 783, 188-191 (2016). 査読有
DOI:10.1016/j.jelechem.2016.11.023

“ Analysis of beat fluctuations and oxygen consumption in cardiomyocytes by scanning electrochemical microscopy. ” Hirano, Y., Kodama, M., Shibuya, M., Maki, Y. and Komatsu, Y. Anal. Biochem., 447C, 39-42 (2014). 査読有
DOI:10.1016/j.ab.2013.11.008

〔学会発表〕(計 6 件)

“ 走査型電気化学顕微鏡を利用した心筋細胞の拍動解析 ” 奥村 翔、平野 悠、小松康雄、牧与志幸、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

“ 走査型電気化学顕微鏡を利用した心筋細胞の拍動解析 ” 奥村 翔、平野 悠、小松康雄、牧与志幸、日本バイオメーキング学会、2016 年 9 月 6 日、名古屋市立大学 (愛知県・名古屋市)

“ 樹脂製ニードル型マイクロ電極の開発とその特性 ” 平野 悠、小松康雄、電気化学会、2014 年 3 月 30 日、関西大学 (大阪府・吹田市)

“ 二本鎖間架橋化 DNA を活用した電極界面上での酵素反応場の構築 ” 平野 悠、小玉実生恵、小綿恵子、池上真志樹、小松康雄、薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 28 日、熊本大学 (熊本県・熊本市)

“ 電気化学測定を利用した一細胞動態解析技術の開発と細胞毒性試験への展

開 ” 平野 悠、小綿恵子、小玉実生恵、小松康雄、シンポジウム：細胞アッセイ技術の現状と将来、2013 年 11 月 25 日、東京大学 (東京都・目黒区)

“ 走査型電気化学顕微鏡を利用した心筋細胞の拍動解析技術の開発 ” 平野 悠、小玉実生恵、渋谷真宏、牧与志幸、小松康雄、日本分析化学会第 62 年会、2013 年 9 月 10-12 日、近畿大学 (大阪府・東大阪市)

〔その他〕

ホームページ等

<https://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-bimo/research3.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

平野 悠 (HIRANO YU)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：70415735