

多種における心臓の発生発達機構の解明 —心臓の物理学的形成を定量的に調べる 3D 検出装置の開発—

1. 研究の目的

近年生物の胎児・胚期における発生・発達において、遺伝的以外の環境による各臓器の発生・発達や配置の影響についての興味が高まっている。ヒトで言えば、先天的と言われる出生時の疾患においても、母胎内の環境の影響を否定できない。そこで、我々はモデル生物として、ニワトリとゼブラフィッシュを主に用いて、環境が与える発生への影響について調べる。独創的な点は、生物の発生期の物理・化学的環境をアクティブに制御して、その環境が発生に与える長期的な影響・応答を調べる点である。そのためには装置の創作からスタートする必要がある。ニワトリをモデル生物にする理由は、ニワトリ胚が環境下でバランスを取りながら各臓器のサイズ・配置などが相補的に決定して、わずかな初期段階における環境の差が個体差になるとの推論がある(T. Mikawa, et al., *Seminars in Cell & Developmental Biology* **18**, 90, 2007)。また、ニワトリ胚は、殻外での孵化に成功した田原氏の無殻培養法 (Y. Tahara, et al., *JPSA*. 51, 307-312, 2014)を適用することにより、*in vivo* としての直接観測が可能になった。そこで、環境制御の装置製作と無殻培養法により発生初期における環境が発生に与える影響の直接観測を試みる。特に発生において最重要と思われる心臓を器官として選択する。心臓観測は *in vivo*, *in vitro* そして、拍動のダイナミクスにフォーカスをする。ゼブラフィッシュにおいては、具体的に生命科学的見地から、これらの骨魚類の心臓発生において、Elastin b タンパク質による細胞外環境の粘弾性の変化が心臓を構成する細胞の細胞運命決定に重要な役割を担っていることが示唆されている (Moriyama et al., *Nat Commun* 2016)。そこで本研究では心臓に存在する細胞外マトリックスの粘弾性を測定することにより、心臓の受ける物理的環境と心臓の硬さ、そして心臓の形態変化の相関を見出す。よって、研究の目的を下記の(1) (2)とする。

(1)ニワトリ胚の無殻培養法を行い、ニワトリ胚の心臓の発生期における心臓の 3D 観測をしながら心臓の形状変化、硬さ、拍動 (拍動間隔、血流)を解析する。物理的環境や胎児のサイズを評価して、心臓の形態変化との相関を調べる。ゼブラフィッシュでは、発生期の心臓の硬さの変化を捉える。

(2) **active** に物理的環境を制御するシステムを構築する。そして、**Feedback** 機構の付加により、外的環境を心臓の発生・発達の状況により調整する。

2. 研究の計画

(1)心臓発生の観測

①ニワトリ胚の発生期における心臓の形態変化と拍動を、個々のニワトリ胚の成長と共に時系列で観測する。そのために断層像を含む 3D 観測を行う必要があり、光干渉断層撮影(OCT)を行う。胚自体の観測は、インキュベータ内に光学的観測系を構築して長期的に行う。胎児のサイズを評価して、心臓の形態変化との相関を調べる。光学顕微鏡により、拍動の観測(拍動、拍動間隔、血流)を行う。

②物理的環境の制御により、個体の発生、成長と心臓の形態変化や拍動との相関を観測する。具体的には、すでに **fatal** と知られているエタノールやアセトアルデヒドの添加、次に、低温下(30°C)において、ニワトリ胚とその心臓の観測をする。特に心臓の形態がチューブ状から、ヒトと同様の4つの心房・心室へとドラマティックに変化する E1 から E4 期にフォーカスをする。

③高速画像処理の観測系のテストを兼ねて、組織片(φ300μm 程度)の心房、心室の自律拍動の観測をインキュベータ内で長期的に行い、48h 以上の観測により自律拍動の安定性を観測する。次に組織片を物理的に接触させて、個々の自律拍動の同期化の可能性を調べる。この観測系においては、画像処理から、拍動間隔、オプティカルフローによる拍動モーションなどの生理学的な情報のオートメーションによる定量化のフローも構築する。

④真骨魚類のモデル生物としてゼブラフィッシュを用い、心臓を脱細胞化し細胞外マトリックス

スのみを残すことを試みる。いくつかの先行研究において複数の異なる手法が用いられており、まずはそれらを追試する。脱細胞化したサンプルを原子間力顕微鏡によって測定するために、カンチレバーの先端に直径 5 μ m 程のビーズを付加するなど、生体組織に適した条件を検討する。

(2) Feedback 機構付きの物理的環境制御システムの構築

①active に物理的環境を制御するシステムを構築する。そして、Feedback 機構の付加により、外的環境を心臓の発生・発達の状況により調整する。本年度は、有精卵の注文から実験までの三週間に及ぶ研究サイクルに関して、様々な時間制限を受けたので、リモート・オートメーションでの観測が可能な実験と装置開発に集中した。まずは *in vitro* による心筋+繊維芽細胞の共培養を行い、安定した周期的自律拍動をする心筋細胞に力学的刺激を与える系を構築して、その刺激に、Feedback 機構を付加する。この機構は、リアルタイムで画像処理を行い、拍動の情報を取得して、特に拍動のタイミングと刺激のタイミングの位相制御をゴールとする。

3. 研究の成果

(1) 心臓発生の観測

①, ②ニワトリ胚の発生期における心臓の形態変化、拍動をE4まで、OCTにより観測することに成功した。OCTステージ状に、インキュベータ内と同様の温度を維持する装置を自作した。成果として、個々のニワトリ胚の光学的観測(図1)とOCT像の3D 画像取得(図2)に成功した。下記のコントロールの生存率から、観測によるダメージはなしと判断できた。OCTによる断層像を含む3D像と、インキュベータ内への観測系の構築によるニワトリ胚の長期的な観測により、胚のサイズと、心臓の形態変化との相関を調べることが可能になった。また、現在、光学顕微鏡の解析による血流の流量の見積もりと心臓機能の定量化も行っている。

環境に変化を与えたニワトリ胚のE4までの生存率は、エタノールは67%、アセトアルデヒドは93%、低温下(30 $^{\circ}$ C)は90%で、コントロールは90%だった。nativeの殻内における生存率は90%程度より、エタノール以外の環境変化による生存率への影響はなかった。一方で、エタノール投与の生存率は先行研究と同程度だった。よって、無殻培養とOCT観測によるニワトリ胚の生存への影響はなしと判断できる。エタノール投与では、チューブから4つの部屋に分離する過程において、一時、LOOP状になるが、その際に、その曲率と、チューブの体積にコントロールとは、顕著な違いがみられた(図3)。また、拍動間隔にも不整脈の振る舞いが見られた。拍動間隔の不安定化は、他の環境変化では見られなかった。現在、その違いを統計的に評価するために

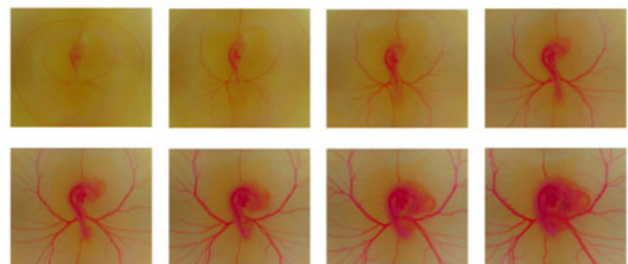


図 1. インキュベータ内のニワトリ胚観測. E1~E4 までの胚のサイズと血管の評価を行う。

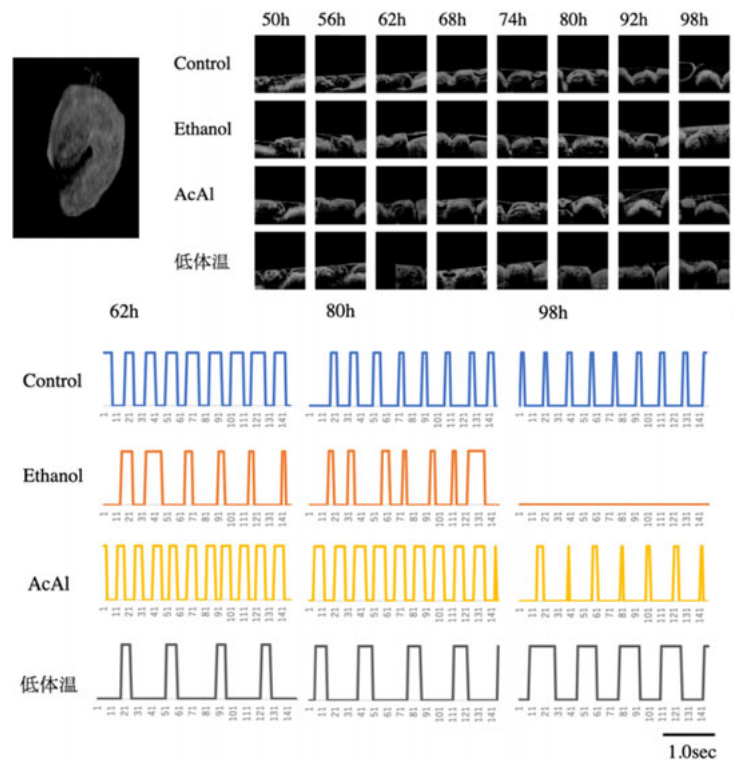


図 2. E2 の心臓の OCT3D 像と 2D 断面図の時系列、そして 2D の連続画像から評価した拍動間隔。

継続して実験を続けている。

③心房と心室の組織片 ($\phi 300\mu\text{m}$)における拍動の長期的観測 (> 40h連続)に成功した。二つの部位の自律拍動の間隔、拍動モーションを実験的に評価した。次に組織片のペアを接触させ、部位による同期の確率を評価した。この同期化の観測は、典型的な倒立顕微鏡の培養ステージ状では、サンプル数に制限があり、また、二日間程度の長期的な撮影期間が必要となるため、複数の高解像度USB顕微鏡をインキュベータ内に設置するなど、観測系を自作した。結果は、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。特筆すべき点は、心房はアクティブなクロックの役割を担い、心室は能動的に拍動の伝搬を受け入れていた。また、同期する前の拍動の動きをオプティカルフローにより、時系列で調べた。その結果として、二つの組織片の接触面の動きが同期化に重要であることを発見した。[S. Arai and T. Mitsui, Bioeng. J7(3): 81, 2020]。

④脱細胞化については複数の手法を試みた結果、界面活性剤を用いる手法によって効果的に脱細胞できることを見出した。他の手法としては凍結融解を繰り返すなどがあるが、この手法では組織が破壊されてしまった。原子間力顕微鏡による細胞外マトリックスの粘弾性の測定では、カンチレバーにビーズを付加する手法を確立し、実際に粘弾性の測定をおこなうことができた(図4)。

(2) Feedback 機構付きの物理的環境制御システムの構築

①自律拍動を行う細胞の集合体に対して、リアルタイム画像プロセッシングにより、その自律拍動との位相を制御して、物理的刺激を長時間にわたり与える装置を完成した。つまり、Feedback 機構の付加した刺激系の装置開発に成功した。時定数は100 msecで、自律拍動と逆位相で刺激を与える場合は問題ないが、自律拍動のタイミングで刺激をする場合は、一周分、遅らせて刺激を行うことで、位相差制御による力学的刺激を行うことができた。この100 msecの遅れを短くするために、画像処理の高速化、カメラのアップグレードを検討している。また、先駆的结果として、自律拍動と同位相/逆位相における刺激への応答は、生理学的(拍動間隔とその分散)に違いが観られた。一方で、生物学的(細胞の集合体の形状や、共培養による繊維芽細胞の増量)には、その多くに違いが観られるのだが、刺激開始時(初期条件)の個体差を引きずっている可能性があるため、初期条件の統一が今後の鍵となる。しかし、位相差制御による外部刺激を自律拍動の拍動リズムへの散逸と考えれば、位相による応答の違いが観測ができたことは生理学的・物理的にとても興味深い。

4. 研究の反省・考察

(1) 心臓発生の観測

①、②本研究振興資金により購入したOCTの高速波長スイープ用の光源により、心臓の発生の3D観測に成功した。特にチューブから心房・心室の4つの部屋への形状の変化を定量的に捉えることができた。OCTステージ上に培養環境の構築を試みて、安定した拍動を継続的に得られるセルを完成させたが、有精卵の無殻培養による個々の成長と、その環境による発生の違いを統計的に議論するためには、1個体の継続的観測よりも、異なる環境を与えた10個体程度のニワトリ胚の平行観測のほうが望ましい。結果的に、4時間、あるいは6時間ごとに、10個体程度の胚の成長を、マニュアル操作によりOCTによる観測を行った。光学的観測による血流や個体のサイズと心臓の発生との相関の解析に関して、簡易的だが、血管の断面積を定量化する必要があり、今後は、心臓以外の血管等のOCT観測も必要と判断した。

③組織片による同期化の実験は、長期的に安定した観測を続けることにより成功した。特に部

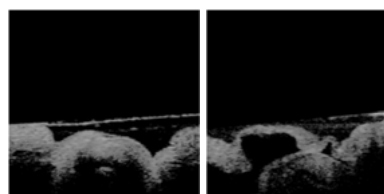


図3. E3.5の心臓のOCT像. 左図は control で右図はエタノール投与の心臓断面で、エタノール投与の心室体積の増加が顕著に表れた。

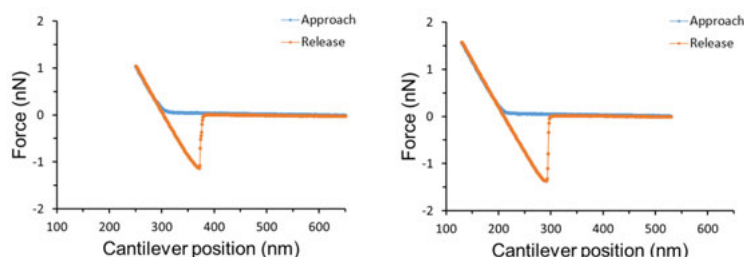


図4. 細胞外マトリックスの粘弾性の測定. ゼブラフィッシュの心臓を脱細胞化し細胞外マトリックスの粘弾性測定に成功した。

位の異なる組織片ペアの同期化の結果において、組織片の接触面の動きが同期化に関係することは興味深く、今後はgap junctionなどの分布を調べるための蛍光観測が必要がある。推測としてmechano-sensing ion channelの密度変化と同期化までの時間に相関があるはずだ。同期化に境界の動きが必要ならば、この境界のmechano-sensing ion channelの不活性化等の薬剤使用による実験も検討する必要がある。一方で、この動きに似せた刺激のパラメータを、(2)①の刺激に適応することにより、心筋細胞の集合体に、“効果的な動き”を与えられる。実際に、メカニカルな刺激に関して、刺激のモーションが速すぎると細胞がダメージを受ける。逆にモーションが遅すぎると、細胞の応答が見られない。そこで、今回の効果的な動きのパラメータが、刺激モーションのレファレンスとして期待できる。

④実験系の確立に時間がかかってしまい、まだ多くのサンプルを測定するに至っていない。今後はゼブラフィッシュ心臓に存在する細胞外マトリックスについて、心臓の各部位(心房、心室、流出路など)の粘弾性を比較すること、またelastin bノックアウトゼブラフィッシュの作成も完了しているので、Elastin bタンパク質非存在下における細胞外マトリックスの粘弾性も測定していく。

(2) Feedback 機構付きの物理的環境制御システムの構築

①in vitroにおいて、自律拍動を行う心筋細胞の集合体にリアルタイム画像プロセッシングにより、自律拍動との位相を制御した刺激を与えることに成功した。時定数の100 msecは、少し遅いので、この時定数を短くするためのドライバーの改良が必要である。実験に個体差の影響が出ないように、刺激開始時の心筋細胞の集合体のサイズや自律拍動の拍動間隔をできるだけ統一できるような培養法の検討も必要である。in vivo (無殻培養下のニワトリ胚)における拍動観測に関しては、リアルタイム観測を継続的に行いながら、心臓に刺激を与える装置の開発に努める必要がある。ただし先駆的に行った力学的刺激の実験において、卵黄に傷をつけると、胚がダメージを受けて、生存率の低下が顕著になる。外部刺激による拍動の励起には、他の手法が必要と考えられる。現在、赤外線パルスによる拍動の励起を検討し、装置を構築中である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①Shin Arai, Kento Lloyd, Tomonori Takahashi, Kazuki Mammoto, Takashi Miyazawa, Kei Tamura, Tomoyuki Kaneko, Kentaro Ishida, Yuuta Moriyama, Toshiyuki Mitsui, Dynamic Properties of Heart Fragments from Different Regions and Their Synchronization, Bioengineering (Basel) 2020, Jul 29;7(3):E81. doi: 10.3390/bioengineering7030081.

(2) 口頭発表

①渡辺 隆太、守山 裕大、三井 敏之、自己組織化過程における細胞挙動の解析、第68回応用物理学会春季学術講演会 2021年3/16 (火) -19 (金)

ポスター発表

②Shota Nozaki, Kazuki Mammoto, Ryu Kidokoro, Ryuta Watanabe, Yuuta Moriyama, Toshiyuki Mitsui, Mechanical stimulus with real-time feedback on beating cardiac cells, America Physics Society March Meeting 2021

③Ryu Kidokoro, Kazuki Mammoto, Yuuta Moriyama, Toshiyuki Mitsui, EFFECTS OF MECHANICAL STIMULUS ON BEAT SEQUENCE OF CARDIOMYOCYTES WITH FEEDBACK CONTROL, 65 th America Biophysical Society Annual Meeting, Feb. 22-26, 2021

④Shota Nozaki, Kazuki Mammoto, Takashi Miyazawa, Ryuta Watanabe, Yuuta Moriyama, Ryu Kidokoro, Toshiyuki Mitsui, Beat sequence of cardiomyocytes affected by to mechanical stimulus with real-time feedback control, The 58th Annual Meeting of the BSJ, 群馬大学 (オンライン) 9/16-18, 2020

⑤野崎 庄太、万本 和輝、城所 龍、渡辺 隆太、守山 裕大、三井 敏之、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、2021年第68回応用物理学会春季学術講演会 3月17日(水) 11:00 ~ 11:50

⑥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、心筋細胞と線維芽細胞の共培養におけるダイナミクス, 2021年第68回応用物理学会春季学術講演会 3月17日(水) 11:00 ~ 11:50

(3) 出版物

なし