

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

胎児の心臓の発達は、生命科学の分野では遺伝的なものと考えられてきたが、臨床の現場では環境要因の影響を受けていることが示唆されている。すなわち、後天的にヒトの胎児に先天性心疾患（内臓心房複合体、内臓逆位など）を誘発し、母胎内の環境、つまり外的因子が影響をしているとの考えである。胎児の発生・発達をマイクロなスケール、すなわち細胞単位で考えると、細胞の分裂、増殖、分化は、周囲の細胞が作り出す環境（KやClなどのイオン、酸素分子、力場）に敏感に影響をうける。in vitro と呼ばれるシャーレ上での実験では、これらの細胞への化学的薬剤の投与や機械的なストレスの影響が調べられ、薬剤試験にも、この系がもちいられる。心臓の構成する心筋細胞は、in vitro、つまり、シャーレ上で伸縮運動を行う。そして、他の心筋細胞と集合体をつくり、伸縮を同期化する。この現象が、起源となり、心臓組織による拍動運動が起こる。細胞レベルでは、化学的薬剤の投与や機械的なストレスなどの外的因子に敏感で、特に胎児期の細胞では、薬剤等による拍動機能の低下が報告されている。また、近年では、力学的刺激に応答するチャンネルが、発生期には、とても豊富で、発生による形状変化にも、力学的な刺激やストレスが寄与をする可能性がある。本研究グループでも、ソフトマテリアル上での心臓の初代培養で生成する、心筋細胞の集合体に、メカニカルな刺激を与えて、その影響を観測してきた。本課題では、特に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を行い、その自律拍動との位相を制御して、力学的刺激を長時間にわたり与える装置を完成した。また、このような in vitro における実験から、心臓の発生過程における、外的因子の影響が予想されていて、例えば先天性心疾患では、環境による影響が臨床の現場から示唆されている。しかし、in vivo における、外的因子の影響の直接観測は行われていない。理由は、単純に母胎内の胎児の体内の心臓を観測することが難しいからである。超音波スコープでは、解像度の限界があり、CTはX線を使用するので、胎児の心臓観測には適さない。そこで、本研究では、動物実験として、ニワトリ胚とゼブラフィッシュの心臓の発生過程を観測する装置を構築する。そして、薬剤投与の第一段階として、エタノール投与、カフェイン投与、低温による鶏胚の、特に心臓の発生の違いの観測を試みた。また、ゼブラフィッシュでは、心臓の硬さと心臓の形態変化を調べて、部位による違いを評価する。そして、発生期の心臓の硬さの変化のレファレンスを作成して、次に外的刺激の影響を調べる装置を開発する。

2. 研究の計画

- (1) 鶏胚を殻の外で成長させて、心臓の発生過程を近赤外線によるトモグラフィーである光干渉断層撮影(OCT)により観測をする。
 - ① 特定の環境が心臓の発生に与える影響を、3Dの時間変化、つまり4D像により調査する。期間は発生後から約4日間とする。すでに知られているCT像などと比べて、観測によるダメージがないかを確認する。
 - ② 過去の調べられている薬剤投与の例として、エタノールやカフェインがある。致死率等の統計的データがある。殻外による成長における致死率と比べて、同程度であれば、それらの薬剤による影響と特定できるので、その薬剤が心臓に与える影響を、OCTにより観測する。また、発生の遅れが確認されている低温による発生の観測も行う。
- (2) 心筋細胞の集合体の自律拍動をインキュベータ内で長期的に観測を行い、リアルタイムフィードバック制御による力学的刺激を与える。
 - ① 刺激に対する応答と、自律拍動のタイミングを調べるために、同一個体で、位相差をパラメータとする。刺激を与えながら、応答を調べる。
 - ② 長期的に、細胞の集合体の形態変化も含めて、刺激を与え続け、拍動間隔の変化、応答の感度の変化を、48hにわたり調べる。
- (3) ゼブラフィッシュの心臓の硬さを調べるための試料台と、AFMによるフォースカーブを得る。
 - ① 真骨魚類のモデル生物としてゼブラフィッシュを用い、心臓の硬さの測定のために、脱細胞化し細胞外マトリックスのみを残し、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。カンチレバーの先端は、非常に鋭角のため、そのままだと心臓に穴をあけてしまう。そこで、レバーの先端に直径5μm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。

3. 研究の成果

(1) 鶏胚心臓の光干渉断層撮影 (OCT) による観測

①2021年度は殻外鶏胚の成長の成功と共に、OCTにより1個体の心臓の発生過程の精密な観測に成功した。光源のアップグレードによる効果が大きかった。複数の個体で、心臓の奇形と判断できる心臓の像の取得にも成功した。形態変化の報告は過去にもあるが、申請者の知る限り1個体の発生過程を追いながら、心奇形となる心臓の観測は世界初である。

②エタノールやカフェインの添加、そして、低温における鶏の発生を観測を行った。過去の報告と、同程度の致死率が得られた。OCT観測では、光源のアップグレードにより、エタノール添加における、拍動低下のみならず、心奇形と考えられるOFTと呼ばれる部位の形状異常が確認され、また、拍動の連動を精査すると、血流ポンプとして機能をしていないことがわかった。カフェイン投与では、過去の報告にある拍動間隔の低下はみられなかったが、胚が成長するにつれて、痙攣を起こすような動きが観測された。心臓以外にも神経系に異常をきたすとの過去の報告があり、現在、神経の異常と痙攣との関連の調査をしている。低温の観測では、発生が遅れるのは観測されたが、発生の遅れは個体差が大きく表れ、今後調査が必要である。

(2) 心筋細胞の力学的刺激応答

①心筋細胞の集合体への、外的、力学的刺激による応答の観測に成功した。特にリアルタイムフィードバック制御による力学的刺激では、明らかに位相差（自律拍動と刺激のタイミング）による影響が確認された。

②長期的な効果では、位相差に関して、同期、逆位相、そして、自律拍動の直前をタイミングとして刺激を与え続けた。同期では、自律拍動に変化はあらわれず、一方で、逆位相では、拍動は一時的に不安定になり、24hの刺激により、拍動間隔は1.5倍程度に遅くなるが安定化した。直前をタイミングでは、最初の10h程度は、拍動間隔が短くなるが、その後、徐々に長くなった。細胞の集合体の形態変化に関しては、剥がれが多く観測されて、共培養であり線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化が予想され、現在、共焦点顕微鏡による抗体染色にて、定量的に分化の割合を調べている。

(3) 魚類の心臓の弾性と進化

①ゼブラフィッシュの心臓の硬さを調べる研究では、脱細胞化し細胞外マトリックスのみを残すことが困難だった。昨年度に脱細胞化に成功したと考えていたが、安定したフォースカーブがとれず、異なる脱細胞化の手法を、2021年度は行った。現在も、安定した脱細胞化の実験を継続して行っており、部位や場所による硬さの違いが安定して再現できるようになった。また、測定のためのカンチレバーの針先へのビーズ付着も、担当者が変わり安定して、行えるようになった。

4. 研究の反省・考察

(1) OCTの改良に時間を要したが、光源により得られる最高感度の鶏胚の観測に成功した。

①ヒトの心奇形との関連を調べて、要因の探査が必要である。左右対称の破れの時点に散逸として、物理・化学的刺激を与え、それにより、左右の反転が確認されたら、科学的にのみならず、医学的にも興味深い結果となる。

②各種添加においては、添加の時期を固定したが、明らかにカフェインの影響は、発生時期により異なり、今後は、4つの室が形成された後に、カフェインを投与して、拍動の変化を調べる必要がある。発生初期においては、心臓の変化よりも神経系の異常のほうが顕著に表れたと考察している。痙攣がその症例である。

(2) フィードバック制御による刺激は安定して与えられるようになった。

①位相差による応答は確認されたが、個体差もあらわれた。そこで、2021年度の後半に、初代培養を行う胚の時期を7日目から5日目に変更した。5日目のほうが刺激に応答するチャンネルが豊富という報告があるからだ。しかし、心臓のサイズから使用する個体

数を増やす必要がある。結果として、5日目の細胞の方が、応答が顕著にあらわれた。反省としては、昨年度の早い段階において、5日目の細胞に変更をするべきだった。

- ② in vitro による力学的刺激の与える細胞集合体の応答では、画像処理のための光学的観測を行う。そのためには、インキュベータ内で、バックライトの照射が必要である。結果として連続的に光刺激を与えると、光によるダメージと、培地の温度上昇が懸念され、刺激を与える期間の制限を行った。今後はフラッシュなどの光量削減と、集合体以外の場所への光の遮断のための装置改良が必要である。
- (3) ゼブラフィッシュの心臓の硬さを調べる研究では、安定した脱細胞化に時間を要した。
 - ① 反省点としては、早い段階で、脱細胞化に成功した研究グループに連絡をとり、この手法の修得のために、直接的に指導を受けるべきだった。コロナの状況もあり、出張等のチョイスがなく、自力で脱細胞化のノウハウを磨く必要があった。また、硬さの測定のためのカンチレバーに必要な、針先へのビーズ付着は、付着したビーズ付きのカンチレバーの購入を検討すべきだった。現在は、安定してビーズが付着でき、安価でレバーを作れるメリットを得たが、成果報告に遅れが生じている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

- ① 大堀笙子、山岡喬志、守山裕大、三井敏之、OCT観測による心臓の発生とエタノールの与える影響、第82回応用物理学会秋季学術講演会、2021年9月10日
- ② 城所龍、野崎庄太、小島快斗、佐々木亜優、守山裕大、三井敏之、リアルタイムフィードバックを用いた心筋細胞への力学的刺激の応答、第82回応用物理学会秋季学術講演会、2021年9月10日
- ③ 山岡喬志、松原圭祐、大堀笙子、守山裕大、三井敏之、SS-OCT観測によるニワトリ胚心臓の発生にエタノールが与える影響、第69回応用物理学会春季学術講演会、2022年3月26日
- ④ 2-13-1724 A dynamic self-organization of single cells, Ryuta Watanabe, Riichi Horikawa, Ryu Kidokoro, Shota Nozaki, Yuuta Moriyama, Toshiyuki Mitsui, (Dept. Phys., Aoyama Gakuin Univ.) 第59回日本生物物理学会年会、2021年11月27日
- ⑤ 3-09-1354 Development of a mechanical device for stimulus on cardiac cells with feedback control system, Ayu Sasaki, Kazuki Mammoto, Ryu Kidokoro, Shota Nozaki, Yuuta Moriyama, Toshiyuki Mitsui (Dept. Phys., Aoyama Gakuin Univ.) 第59回日本生物物理学会年会、2021年11月27日
- ⑥ 3-09-1406 Change in phase stability of cardiac cell clusters affected by to mechanical stimulus with feedback control, Shota Nozaki, Ryu Kidokoro, Kaito Kojima, Ayu Sasaki, Yuuta Moriyama, Toshiyuki Mitsui (Dept. Phys., Aoyama Gakuin Univ.) 第59回日本生物物理学会年会、2021年11月27日
- ⑦ 佐々木亜優、城所龍、野崎庄太、渡辺隆太、小島快斗、守山裕大、三井敏之、Real-Time Feedback 機構を用いた細胞集合体への機械刺激による拍動間隔の変化、第69回応用物理学会春季学術講演会、2022年3月23日

ポスター発表

- ① 山岡喬志、大堀笙子、守山裕大、三井敏之、SS-OCTによるE2~E4のニワトリ胚心臓のイメージング、第82回応用物理学会秋季学術講演会、2021年9月21日
- ② 小島快斗、城所龍、野崎庄太、佐々木亜優、守山裕大、三井敏之、心筋細胞と線維芽細胞の集団におけるダイナミクス、第69回応用物理学会春季学術講演会、2022年3月24日
- ③ 小島快斗、城所龍、野崎庄太、佐々木亜優、守山裕大、三井敏之、心筋細胞と線維芽細胞の集団におけるダイナミクス、第69回応用物理学会春季学術講演会、2022年3月25日
- ④ 松木翔、渡辺隆太、守山裕大、三井敏之、AFMによるゼブラフィッシュ成魚の心臓の弾性率評価、第69回応用物理学会春季学術講演会、2022年3月25日

(3) 出版物

なし