

積層化心筋シートの電気生理学的解析



原口裕次

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所

我々はこれまでに、温度応答性培養皿を用いシート状の心筋細胞（心筋シート）の作製に成功している。この心筋シートの重層化による心筋組織の再構築、さらには重症心不全への治療を目指し研究を展開している。今回、積層化心筋シートの電気的結合メカニズムの解明を目的に実験を行った。新生仔ラット由来の心筋細胞を温度応答性培養皿に播種し、数日間培養後、低温処理して心筋シートを得た。積層した心筋シートが電気的に結合するまでの時間は、多点細胞電位記録システムで測定した。2枚の心筋シートは重層後 34 ± 2 分で電気的に結合した。この96%の例で、心筋シートの電気活動は速く拍動するシートに同期し、さらにすべての例で不整脈は起こらなかった。また、免疫組織学的解析および低分子蛍光物質移動試験を用い、心筋細胞の電気的結合に関係するギャップ結合が、30分以内に2枚の心筋シート間に形成されることも確かめた。2枚の心筋シートは重層後、極めて早期にギャップ結合を形成し、不整脈を起こすことなく電気的に結合した。この結果は、不全心に移植しても、心筋シートは不整脈を起こすことなく速やかに宿主心に結合する可能性を示唆する。

1. 緒言：最近、重症心不全の治療法として細胞を用いた再生医療が注目を集め、すでに臨床応用もされている。再生医療には細胞を注射針で不全部に注入する細胞移植療法と細胞から組織を再構築した後、移植する組織工学的手法がある。我々はこれまでに、独自に開発したユニークな組織工学的手法「細胞シート工学」を用い、シート状の心筋細胞（心筋シート）の重層化による心筋組織の再構築、さらには重症心不全への治療を目指して研究を行ってきた。細胞外マトリクスが無傷で存在する心筋シートは、支持体を用いることなく積層化が可能である。心筋シートを積層化

すると密な接着が形成され、積層化心筋シートは電気的に結合し同期して拍動するようになる。この同期して拍動する積層化心筋シートをヌードラットへ皮下移植すると、肉眼でも拍動を確認しうる組織として正着し、すくなくとも1年以上拍動が維持されることが確認されている。今回、2枚の心筋シートが積層後、電気的に結合するまでの時間の測定およびその結合メカニズムの解明を目的に実験を行った。

2. 実験方法：<a> 心筋シートの調製：新生仔ラット由来の心筋細胞を温度応答性培養皿（電子線を用いて温度応答性高分子であるポ

り *N*-イソプロピルアクリルアミドを表面に共有結合させた培養皿)に播種した。そして4-5日間培養後、培養皿を20°Cで低温処理することによりシート状に心筋細胞を脱着させ、得られた心筋シートを以下の実験に用いた。

**** 電気生理学的解析：心筋シートの自発活動電位は、多点細胞外電位記録システム（アルファメッドサイエンス）を用い測定した。1枚の心筋シートを電極に乗せ、さらにその上に一部が重なるように別の心筋シートに乗せ、それぞれの自発活動電位を測定した（Figure 1A）。そして経時的にそれらを測定し、活動電位が一致するまでの時間、すなわち、2枚の心筋シートが電氣的に結合するまでの時間を測定した。

<c> ギャップ結合の検出：心筋細胞の電氣的結合に重要とされるギャップ結合が、積層した心筋シート間にいつ形成されるかについて以下の2方法で調べた。第1の方法は、ギャップ結合の構成蛋白質コネキシン43の発現を検出し、免疫組織化学的にギャップ結合の形成を観察した。Green fluorescent protein (GFP) トランスジェニックラットに由来する心筋シート（GFP心筋シート）とGFP非発現の心筋シート（非GFP心筋シート）を積層し、1時間培養した。その後凍結切片を作製し、間接蛍光抗体法によりコネキシン43の発現を検出した。第2の方法は、ギャップ結合を通過できる低分子蛍光物質カルセインを用い、それが心筋シート間を移動できるようになるまでの時間からその形成時期を推定した。具体的にはカルセインを導入した心筋シ

ートを、非導入の心筋シートに積層し、経時的に蛍光顕微鏡観察を行った。

<d> 心筋細胞および心筋シートにおけるコネキシン43発現の観察：次に心筋細胞および心筋シートにおけるコネキシン43の発現分布を調べた。心筋細胞を通常の培養皿にまばらに播種し、4日間培養後4%パラホルムアルデヒドで固定した。そして間接蛍光抗体法によりコネキシン43の発現を検出した。また、心筋シートの場合、温度応答性培養皿から脱着させた直後、4%パラホルムアルデヒドで固定した。そして凍結切片を作製し、同様にコネキシン43の発現を検出した。

3. 実験結果および考察

<a> 2枚の心筋シート間の電氣的結合の成立：積層した直後、2枚の心筋シートの2次元電位分布を調べると、それぞれの心筋シート内の細胞は電氣的に同期しているものの、2枚のシートは別々の周期の電気活動を示した（Figure 2B）。さらに心筋シートの活動電位の経時変化を解析したところ、2枚の心筋シートは積層後34±2分で電氣的に結合し、同期して拍動した（Figure 2C）。この時96%の例で、心筋シートの電気活動は速く拍動するシートに同期した。また、2枚の心筋シートが電氣的に結合するときに、不整脈は起こさなかった（Figure 2C）。

**** 心筋シート間のギャップ結合の形成：GFP心筋シートと非GFP心筋シートを積層1時間後の凍結切片の細胞組織像を蛍光顕微鏡で観察したところ、GFP心筋シートは緑色の蛍光を示し、非GFP心筋シートと明瞭に区別され、またそれらの境界部がはっきりと観察

された。次に間接蛍光抗体法でコネクシン 43 の発現を調べると、GFP 心筋シートと非 GFP 心筋シートの境界部にコネクシン 43 が認められ、ギャップ結合の存在が示唆された。さらにカルセインを用いた蛍光分子移行試験を用い、心筋シート間のギャップ結合の存在を調べた。すると心筋シート同士を重ねて 30 分後にはすでにカルセイン導入の心筋シートからカルセイン非導入の心筋シートへのカルセインの移動が認められ、それは時間経過とともに徐々に広がっていった (Figure 2A)。一方、カルセイン導入心筋シートから、ギャップ結合が欠損している HeLa 細胞へのカルセインの移動は認められなかったことから、カルセインの心筋シート間の移動はギャップ結合を介していることを強く示唆している (Figure 2B)。免疫組織化学的解析とカルセインを用いた方法から得られた結果により、積層後の 2 枚の心筋シート間にコネクシン 43 によるギャップ結合が極めて速やかに形成され、これを通じて心筋シート間に情報が伝達され、電氣的結合が起こることが強く示唆された。

<c> 心筋シートにおけるコネクシン 43 発現の観察：次に積層後の心筋シート間にギャップ結合が早期に形成される理由を調べるために、温度応答性培養皿から脱着後の心筋シートにおけるコネクシン 43 の発現を検出した。すると細胞間だけでなく、他の細胞と接していない細胞表面あるいは細胞質にも多数のコネクシン 43 の発現が観察された (Figure 3A、B)。一方、まばらに播種した心筋細胞を用いて調べたところ、1 個の心筋細胞ではコネク

シン 43 の発現はほとんど認められず、2 個の接した心筋細胞ではほとんど細胞間のみでコネクシン 43 が検出された (Figure 3C、D、E)。これらの結果は、1 個または数個の心筋細胞と比較して、細胞同士が密に相互作用している心筋シートでは、コネクシン 43 遺伝子の発現がすでに活性化された状態にあり多数のギャップ結合前駆体 (コネクシン 43 六量体) が細胞表面あるいは細胞内にすでに存在していることを示唆している。

4. 結語：今回重層した心筋シートは、不整脈を起こすことなく極めて早期にギャップ結合を形成して電氣的に結合することを示した。このメカニズムとして、心筋シートは細胞同士が非常に密に相互作用していることにより、コネクシン 43 遺伝子の発現がすでに活性化された状態にあり多数のギャップ結合前駆体が細胞表面あるいは細胞内にすでに存在し、心筋シート同士が接触した後、それらの移動のみでギャップ結合を形成できる可能性が考えられる。今回の結果は、不全心に移植しても、心筋シートは不整脈を起こすことなく速やかに宿主心に結合する可能性を示唆する。また今回示された知見は、細胞移植、細胞生物学および電気生理学において、心筋シートの性質が極めてユニークで重要なものであることを示している。

主要論文

1. Haraguchi Y, Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. "Electrical coupling of cardiomyocyte sheets occurs rapidly via functional gap junction formation

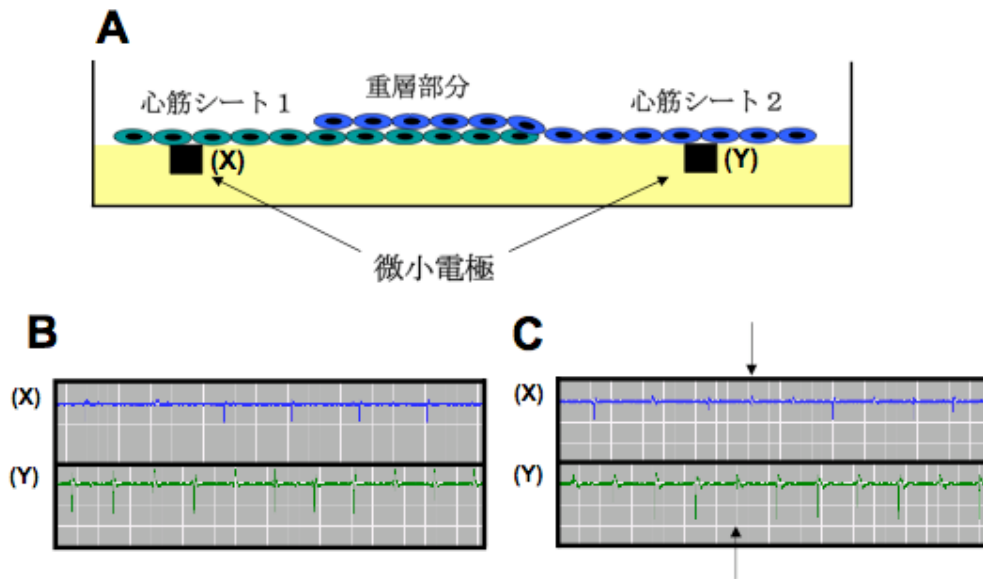


Figure 1 微小電極を用いた積層化心筋シートの速やかな電氣的結合の觀察.
 A: 微小電極プローブ上で積層された2層の心筋シートの模式図. B,C: 積層直後(B) および積層 34 ± 2 分後(C)の2層の心筋シートそれぞれの自発活動電位図. 矢印: 積層した心筋シートの電氣的結合の瞬間

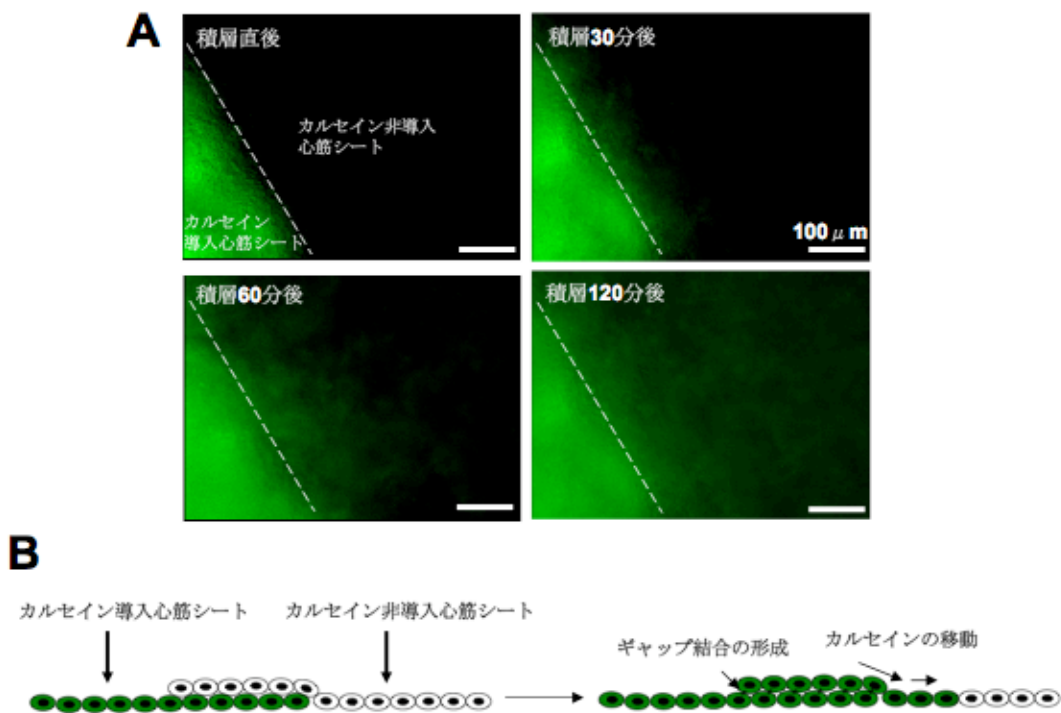


Figure 2 低分子蛍光物質移動現象を用いた積層化心筋シート間におけるギャップ結合形成の觀察.
 A: カルセイン導入心筋シートから非導入心筋シートへのカルセインの広がり. 蛍光顕微鏡を用いた経時的觀察. B: 心筋シートを重層化すると30分程度で心筋シート間にギャップ結合が形成されるため、蛍光物質カルセインがシート間を移動する.

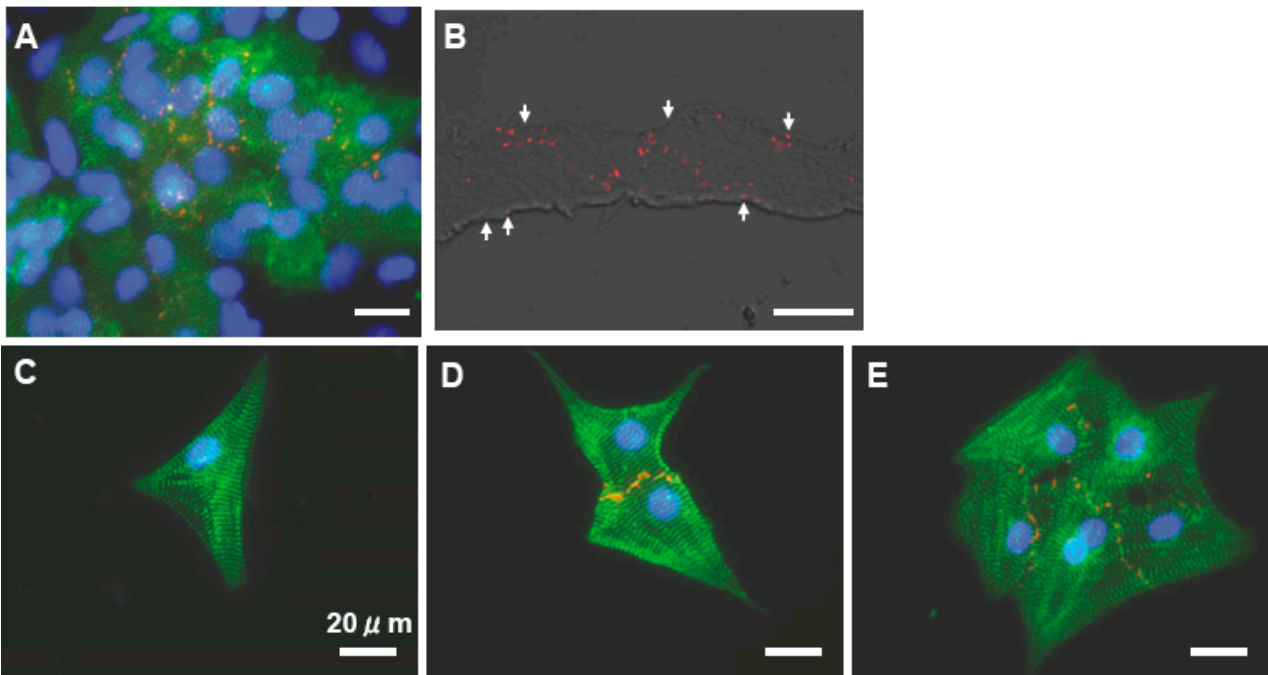


Figure 3 心筋シートおよび心筋細胞におけるコネクシン43発現の観察.
 A,B: 心筋シート. Bは心筋シートの横断面を観察. C、D、E: 1個から数個の心筋細胞. 赤色: コネクシン43、
 緑色: α -アクチニン、青色: 細胞核、矢印: 細胞表面あるいは細胞表面近傍に存在するコネクシン43

Appendix deta

The movie of synchronizing myocardial cell sheets.