

[研究助成 (A)]

生体インプラントを見据えた細胞シート型バイオメモリの開発

2251034

研究代表者
(助成金受領者)

京都府立医科大学 大学院医学研究科

助教

望 月 健太郎

[研究の目的]

本研究の目的は、細胞・組織学的機構に機械的な役割を委ねることで「人間と機械の新たな調和」を実現することである。本助成研究ではその原理実証として、心筋細胞のカルシウムイオン (Ca^{2+}) 動態に着目した細胞シート型バイオメモリの開発に挑み、生体インプラントも見据えた生体内記録や生体内状態の記録への応用性を検証した。

本研究目標の到達により、外部機器や人工素材に依存した従来のデータ管理様式に変革をもたらし、患者の健康状態や既往歴・アレルギー等の個人情報の生体内記録や読み取り、生体内の健康状態を反映する可変的な記録様式への応用に繋げられる。そのデータ記録機構には心筋細胞に備わる興奮収縮運動時の Ca^{2+} の放出と再取り込み作用を利用するため、システムが細胞により自己形成される点において高効率かつ炭素循環性を見込める新たなバイオデジタル技術の創出に期待できる。また、人工多能性幹細胞 (iPSC) 由来の心筋細胞を利用することができれば生体インプラントにおける免疫学的な適合性などの課題も解決することができる。

本助成研究では、心筋細胞がその興奮収縮過程において収縮が完了する度に細胞質内の Ca^{2+} を筋小胞体に取り込み貯蔵する電気生理学的反応 (図 1a) に着目し、筋小胞体に貯蔵される Ca^{2+} 濃度の高低を 0,1 のバイナリ情報として捉えることで組織局所から一細胞単位の

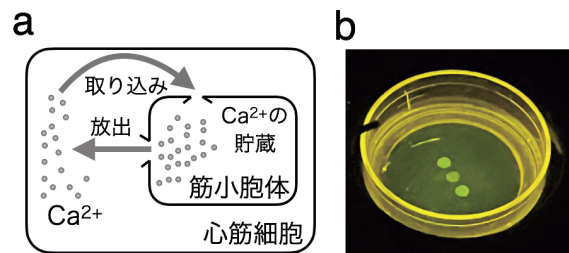


図1 (a) 心筋細胞の興奮時における筋小胞体からのカルシウムイオン (Ca^{2+}) の放出および筋小胞体への再取り込みを示す模式図。(b) 35 mm ディッシュ内に作製されたラット単離培養心筋細胞シート ($\phi 27$ mm) に Ca^{2+} 濃度蛍光指示薬 (Fluo8/AM) およびケージド Ca^{2+} を (DMNPE4/AM) を導入し局所的に紫外光照射を行なった後の Fluo8 蛍光強度を捉えた写真。

空間規模でバイナリデータを記録することが可能であるかどうかを検証した。申請者のこれまでの心臓不整脈に関する研究成果から、 Ca^{2+} 濃度蛍光指示薬 (Fluo8/AM) を用いた Ca^{2+} 蛍光イメージングやケージド Ca^{2+} (DMNPE4/AM) の局所光分解などの光学技術の組み合わせにより、心筋細胞シート局所の心筋細胞における細胞室内 Ca^{2+} 濃度を変調できること (図 1b)、さらには心細胞質内で過剰となった Ca^{2+} が細胞自身による作用によって回収あるいは排出されることはすでに判明している。

以上、心筋細胞の細胞シートを用いたバイオメモリの開発により、人間と機械の新たな調和を目指す。

[研究の内容, 成果]

研究内容

本助成期間内では、①既存光学システムの改変構築、②心筋細胞シートおよび単一心筋細胞を用いた原理検証を主な研究内容として行なった。

既存光学システムの改変構築では、高速 Ca^{2+} 蛍光イメージングが可能な蛍光励起・検出光学系およびケージド Ca^{2+} の局所光分解が可能な紫外光照射光学系から構成される既存光学システムに、本助成により購入した高出力光源・高倍撮像用対物レンズおよびカメラ・デジタルミラーマイクロデバイス (DMD) 制御用機器などを導入した。

心筋細胞シートおよび単一心筋細胞を用いた原理検証では、ラットから単離培養した心筋細胞と市販のヒト iPS 細胞由来心筋細胞のいずれかを使用して作製した細胞シートもしくは疎に播種した心筋細胞群を対象に、Fluo8/AM (5 μM) と DMNPE4/AM (5–50 μM) を細胞内に導入し、紫外光照射による DMNPE4/AM からの Ca^{2+} の放出前後における紫外光照射範囲内外の心筋細胞内の Fluo8/AM 蛍光強度 (すなわち Ca^{2+} 濃度) 変化を最大 400 frame/s の高速 Ca^{2+} 蛍光イメージングにより記録した。

その他、本助成による助成金は心筋細胞単離のためのラット購入・管理費、心筋細胞シート作製のための消耗品類や Ca^{2+} 濃度蛍光指示薬などの試薬類の購入費、iPS 細胞由来心筋細胞の購入・管理費、国内学会発表のための参加・旅費、国内学会誌への論文投稿準備のための諸費用に使用した。

研究成果

心筋細胞シートを対象とした検証結果

心筋細胞シートを対象とした検証では、Fluo8/AM と DMNPE4/AM を導入した細胞シートの局所 ($\phi < 3 \text{ mm}$) に紫外光を照射し、DMNPE4/AM の光分解による局所的な細胞内

Ca^{2+} 濃度を増加させた。その際、濃度増加した細胞内 Ca^{2+} の筋小胞体への取り込みを促すため、電極刺激により細胞シートの興奮収縮を制御した。図 2a は、紫外光照射前後の照射範囲内における心筋細胞の Fluo8 の蛍光強度、すなわち細胞内 Ca^{2+} 濃度の時間推移を示す。電極刺激を行わない心筋静止下 (w/o stimulation) では、5 秒間の紫外光照射により急上昇した Ca^{2+} 濃度が紫外光照射停止後に比較的緩やかに減衰する様子が捉えられた。種々の検証により、本減衰は筋小胞体への Ca^{2+} 取り込みのみならず心筋細胞の $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構の作用による細胞質内 Ca^{2+} の細胞外への排出によって生じていたことがわかった。 Ca^{2+} の筋小胞体への取り込みを優先させるため、細胞シートへの電極刺激 (周波数 0.5, 1, 2 Hz) により心筋細胞の興奮収縮の誘発を試みた。その結果、筋小胞体へ取り込まれた Ca^{2+} 濃度と細胞質内に蓄積する Ca^{2+} 濃度の比率を、それぞれ紫外光照射停止後の Ca^{2+} 濃度減衰過程における興奮収縮ごとの Fluo8 蛍光強度の振幅 (図中 α) と基底値 (図中 β) から見積もることが可能となり、0.5・1・2 Hz それぞれにつき試料数 $n = 3$ の平均において刺激周波数が 1 Hz の際に蛍光強度の振幅が最大となることがわかった。刺激周波数の増加に比例して筋小胞体への Ca^{2+} 再取り込みの効率が高まる (= 蛍光強度振幅が増加する) と予測されたが、2 Hz の刺激周波数では高頻度な電氣的駆動により筋小胞体への取り込み効率が却って低下し、結果として細胞質内に残存する Ca^{2+} 濃度 (基底値 β に相当) が増加したものと推測された。

次に、細胞シートへの 1 Hz の電極刺激下で局所紫外光照射により Ca^{2+} 濃度の変調 (情報の入力に相当) を施して時間を置いた後、再度電極刺激により Ca^{2+} 蛍光強度分布の撮像を行なったところ (図 2b), 細胞シート端 (図中左側) からの電極刺激による Ca^{2+} 興奮伝導の際に、局所的に変調した Ca^{2+} 濃度を可視化できることがわかった。すなわち、局所的な紫外光

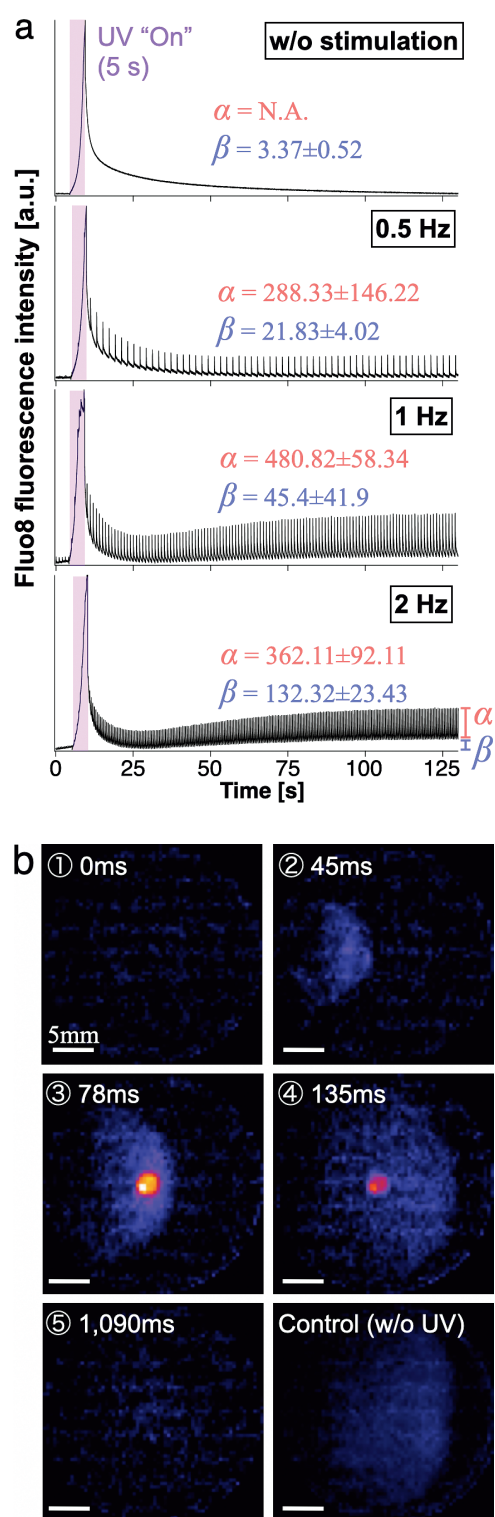


図2 (a) 心筋細胞シートへのUV照射前後における照射領域内のFluo8蛍光強度の時間推移, および電極刺激の有無と周波数の違いによる比較。(b) 1 Hzの電極刺激下でUV照射による局所Ca²⁺濃度変動 (=情報の入力) を施した細胞シートにおける, 電極刺激によるCa²⁺濃度の可視化 (=情報の読み取り)。

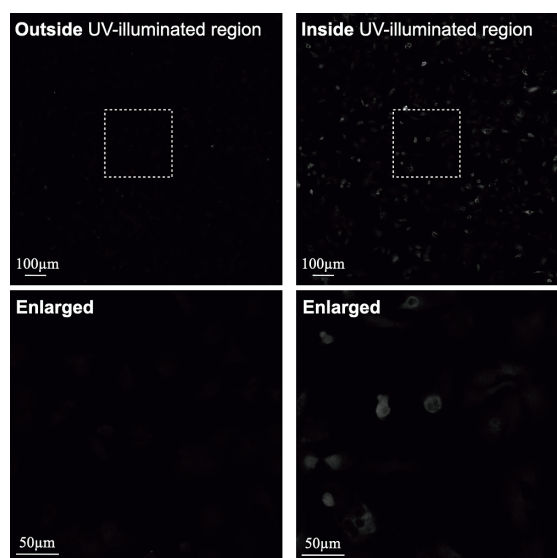


図3 疎に播種された心筋細胞群の紫外光照射領域内外におけるFluo8蛍光強度の比較 (電極刺激時)。紫外光照射領域内では個々の心筋細胞におけるFluo8蛍光強度すなわち細胞内Ca濃度が高いことを示す。

照射により DMNPE4/AM から放出され Ca²⁺ が電極刺激を介して筋小胞体へと蓄積され, その記録を電極刺激により再度可視化 (情報の読み出しに相当) できることを実証できた。

その他, 本研究期間で変調された Ca²⁺ 濃度の持続期間などについても検証を行なった (未発表につき詳細は割愛)。

単一心筋細胞での検証結果

本研究構想では, Ca²⁺ 濃度変動における空間分解能がバイオメモリとして保存可能な情報量に直結する。本研究期間内では, 単一心筋細胞ごと, さらに心筋細胞内の空間規模で Ca²⁺ 濃度の変調と読み出しが可能であるかどうかを検証した。基板上に疎に播種することで単一の状態で分布させた心筋細胞群に, 先述と同様に Fluo8/AM と DMNPE4/AM を導入した後に局所的な紫外光照射を施し, 照射領域内外における電極刺激時の Fluo8 蛍光強度を観察した結果を図3に示す。紫外光照射領域外 (Outside UV-illuminated region) と比較し, 照射領域内 (Inside UV-illuminated region) では疎に分布した心筋細胞が Ca²⁺ 濃度増加に伴う高い蛍光強度を示している様子を示す。本結

果を踏まえ、基板上における細胞密度を増やしながら蛍光強度差により識別可能な最小の空間規模の精査も行なった（未発表）。

総括と展望

本研究期間では、心筋細胞のカルシウムイオン（ Ca^{2+} ）動態を利用した細胞シート型バイオメモリの原理検証を行なった。心筋細胞シートを用いた検証から、光学技術により細胞シート局所における筋小胞体の Ca^{2+} 濃度の変調が可能であることを実証し、その保存期間の検証も行なった。また単一心筋細胞を用いた検証から、細胞単位で筋小胞体の Ca^{2+} 濃度の変調と読み出しが可能であることも示され、制御可能な最小の空間規模について精査を行なった。総じて、細胞シート型バイオメモリの基礎的な原理検証が完了したと判断する。一部の研究成果は2件の国内学会で発表を行い、現在国内学術誌への投稿も準備中である。

今後は、バイオメモリとして入出力可能な情報量と情報保持期間の改善や最適化を試み、動物実験による生体インプラントへの応用段階に移行する予定である。

謝辞

本研究は、公益財団法人 立石科学技術振興財団 2025 年度研究助成（A）の支援により行われました。昨今の世界的な材料不足や円安により研究資源の価格が高騰する中、多大なご支援を賜りましたことに心より感謝申し上げます。本研究のさらなる発展を目指し、引き続き精進致します。

〔成果の発表、論文など〕

望月健太郎, 田村昌子, 森下祐馬, 原田義規, 田中秀央「培養心筋細胞層における興奮発生・伝導の光学的制御」日本バイオマテリアル学会関西ブロック第 20 回若手研究発表会（2025 年 8 月 2 日）

望月健太郎, 田村昌子, 森下祐馬, 原田義規, 田中秀央「心筋細胞層における興奮波発生および伝導の光学的制御」第 66 回日本組織細胞化学学会学術集会（2025 年 25-26 日）