

# 心筋培養法の発展, 現状, 未来

五島 喜與太\*

## はじめに

生体内心臓の示すさまざまな生理機能や障害を、培養系あるいは単離細胞系というたいへん単純化したモデル系を用いて解明しようという試みが、1960年頃からはじめられ、近年盛んになってきた。生体内心臓では、心筋細胞は神経、結合組織、血管、血球などの複雑な組織構築のなかで、細胞間ならびに組織間相互作用のもとに機能しているのに対し、培養系、単離細胞系では、心筋細胞はそれらの他の組織から解剖学的にも、機能的にも完全に分離されている。それゆえ、培養系は、イオンや薬物の心筋細胞への作用をより直接的に解析できるという利点を有している。

心筋組織では、心筋細胞間接合部に、巨視的には介在板、微細形態学的にはデスモソーム、接着野 (fascia adherens) ならびにギャップ結合の構造が観察されている。ギャップ結合部の電気抵抗が、他の細胞膜部分に比べて著しく低く、それゆえ、一つの心筋細胞に生じた興奮に伴う局所電流がギャップ結合微細孔を横切って隣の心筋細胞に伝達される方法で興奮伝達がなされ、同期したリズムの心筋拍動が生じる。また、ギャップ結合微細孔を介して、 $\text{Na}^+$  などのイオンや分子量500程度の化合物が細胞間を自由に往来していることが知られている。

これらの知見は、心筋組織のなかの心筋細胞は全て、生理学的にも生化学的にも強い細胞間相互作用の場におかれていることを示している。培養系では、心筋細胞を細胞間相互作用のない1個1個ばらばらに単離された細胞として扱える一方、

おのおのの細胞が互いに接着して同期拍動を示す多細胞シートのふるまいをとおして、細胞間相互作用をも検討し得るという点で優れた特長を有している。

本稿では、培養心筋細胞ならびに単离心筋細胞の研究現状について述べ、次に最近注目されている自動拍動という生理機能を保持しながら培養系で増殖し続けるという心房がん由来の株細胞を中心に将来の展望についても記述したい。

## 1. 培養心筋細胞の不整拍動

妊娠14~16日目マウス胎児、あるいは孵卵5~6日目ウズラ胚心臓をトリプシン処理して得た分離細胞をシャーレにまいて、適当な培養液中でインキュベートすると、培養1日目にはシャーレ底に接着し、自動拍動している単一心筋細胞や、それらが互いに接触してできた細胞シートが観察される。ひとつの細胞シートを構成している心筋細胞の拍動リズムは同期している。この同期化の機構は、成体心臓の場合と同様、細胞間に電氣的抵抗の低い接合 (ギャップ結合) が形成され、その結果、興奮伝達が行われることによる。培養法については成書<sup>1)</sup>を、また、分離心筋細胞の拍動の基礎的性質については総説<sup>2)</sup>を参照していただきたい。

単一分離心筋細胞も細胞シートも正常な培養液中では規則正しいリズムで自動拍動しているが、培養液の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度増加、 $\text{K}^+$  濃度の減少、あるいは強心配糖体のひとつであるウアイン添加により、不規則なものになる。細胞培養系を用いて得られたひとつの重要な知見は、興奮伝達の全く起こりえない単一心筋細胞にも不整拍動が生じることを示したことであろう (図1)。

\*神戸学院大学人文学部生物学研究室

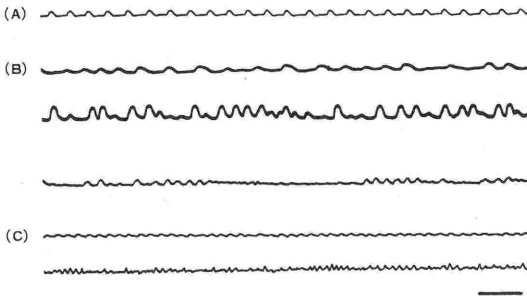


図1 マウス胎児心臓より分離, 培養(1日)した単一分離心筋細胞のウアバインによる不整拍動 (A): ウアバイン添加前の整拍動, (B)(C): 不整拍動. スケール: 1秒.

次に, ウアバイン誘発不整拍動, そのなかでも図3-Cのように細胞が細かく震えるような悪化した様相の不整拍動の生成と, 抗不整脈剤によるその抑制のイオン機序についての筆者らの考え方(図2), ならびにその考えに至ったいくつかの実験を紹介したい.

心筋の筋原線維のサルコメア長さは, 細胞内の遊離  $Ca^{2+}$  イオン濃度により抑制されていることはよく知られている. 細胞内  $Ca^{2+}$  濃度がおよそ  $10^{-7} M$  程度のときには心筋は弛緩状態にあり, サルコメア長さはおよそ  $2.2 \mu m$  である. 一方,  $Ca^{2+}$  濃度が10倍程度増加すると, すなわち  $10^{-6} M$  程度になると心筋は収縮し, サルコメア長さはおよそ  $2.0 \mu m$  まで短縮する. これらの知見は, サルコメア長さを経時的に連続測定することにより間接的にはあるが, 細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の変動を見積ることができることを示している. 偏光顕微鏡のもとで, ウズラ胚心筋細胞の筋原線維の収縮-弛緩の様相を細胞を生かしたままの状態で観察することができる. 図3-Aに示すように, 正常拍動時にはサルコメア長さは  $2.2 \mu m$  から  $2.0 \mu m$  の範囲で収縮-弛緩のサイクルを繰り返す. 一方, 不整拍動中では, サルコメア長さは  $2.0 \mu m$  から  $1.95 \mu m$  の範囲内で, 小さな振幅の変化をしており(図3-B), このことは, 不整拍動中では, 心筋細胞内  $Ca^{2+}$  濃度はいつも高い値 ( $10^{-6} M$  あるいはそれ以上) のところで変動していることを示していよう<sup>3)</sup>. 細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の恒常的増加により, 筋原線維はたえず縮みぎみになり, 正常拍動ができなくなるのであろう. また, この点は心筋では十分証明されていないが,

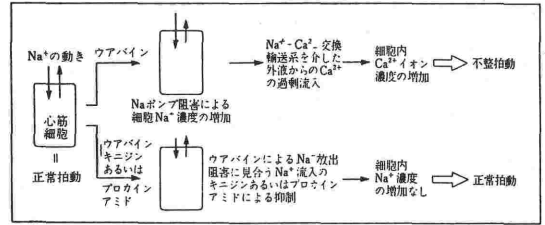


図2 培養マウス胎児ならびにウズラ胚心筋細胞のウアバイン誘発不整拍動と抗不整脈剤(キニジン, プロカインアミド)によるその抑制の機序に関して,  $Na^+$  と  $Ca^{2+}$  動態から検討したひとつの仮説(治療学, 11, 505, 五島ら1983, よりライフ・サイエンス出版の許可を得て転載)

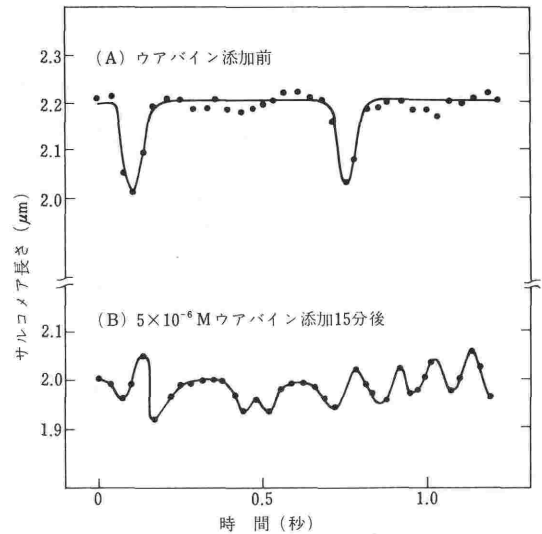


図3 培養ウズラ胚心筋細胞の筋原線維の収縮-弛緩に伴うサルコメア長さの変化に対するウアバインの影響

神経や骨格筋の場合と同様に, 細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の増加は膜興奮性をも抑制し, この作用も不整拍動の成因になっているものと考えられる. では, その  $Ca^{2+}$  はどこから運ばれてくるのであろうか.

ウアバインは細胞膜に存在する  $Na^+ \cdot K^+ - AT-Pase$  活性 ( $Na$  ポンプ) を阻害し, その結果細胞内  $Na^+$  濃度は徐々に増加した(図4). 心筋細胞への外液  $Ca^{2+}$  の取り込み初速度も, ウアバイン添加により, 細胞内  $Na^+$  濃度の上昇とほぼ同じ時間経過で上昇し, いずれも, 正常値のほぼ1.5倍以上に達した時点で不整拍動が生じた. ウアバイン添加によりいったん増加した細胞内  $Na^+$  濃度,  $Ca^{2+}$  取り込み速度が, ウアバイン除去によ

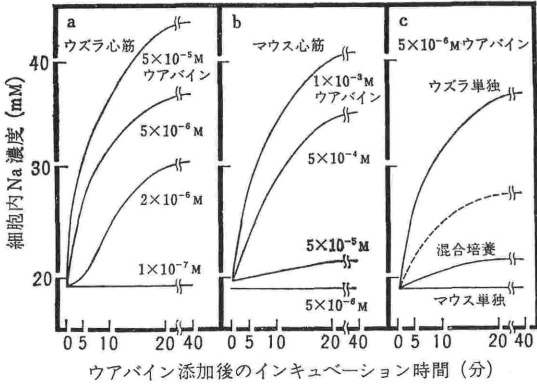


図4 ウアバイン添加によるウズラおよびマウスの細胞内 Na<sup>+</sup> 濃度の変化

りほぼ同じ時間経過で低下し、それに伴って正常拍動へと回復していった。これらの観察は、ウアバイン添加による細胞内 Na<sup>+</sup> 濃度の増加, Ca<sup>2+</sup> 取り込み速度の増加, 不整拍動の三者が密接な関係にあることを示していよう<sup>3,4</sup>。

次に、外液 Ca<sup>2+</sup> の心筋細胞への取り込み速度が、細胞内 Na<sup>+</sup> 濃度に大きく依存していることをモデル実験から明らかにした。心筋細胞を Ca を含まず、Ca キレート剤である EGTA を含む生理食塩水中でインキュベートすることにより、広い範囲で任意の細胞内 Na<sup>+</sup> 濃度を有する心筋細胞を人為的に作成することができた。そこで、いろんな細胞内 Na<sup>+</sup> 濃度の心筋細胞を作成し、そこへ <sup>45</sup>Ca を加えて <sup>45</sup>Ca の取り込み速度に対する Na<sup>+</sup> 濃度の影響を検討した。図5の結果は、生理的な細胞内 Na<sup>+</sup> 濃度が増加することで、大きな Ca<sup>2+</sup> 取り込み速度の増加が生じることを示している。別の反応速度論の実験から、Na<sup>+</sup> 依存の Ca<sup>2+</sup> 取り込みが1種類の担体(キャリア)を介した輸送であること、細胞内 Na<sup>+</sup> 濃度の増加が Ca<sup>2+</sup> 取り込みの K<sub>m</sub> ではなく、V<sub>max</sub> を増加させること、Ca<sup>2+</sup> 取り込みの際に確かに Na<sup>+</sup> の放出が生じていること、つまり Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> 交換輸送系であること、ならびにそのストイキオメトリーが Na<sup>+</sup> (3個) : Ca<sup>2+</sup> (1個) であることを明らかにしている<sup>3</sup>。また、筆者らにより、この輸送系のキャリア物質は部分精製されている。もし、Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> 交換輸送系を介して Na<sup>+</sup> と Ca<sup>2+</sup> 以外のイオンが輸送されないとし、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度がこの交換輸送系によってのみ決め

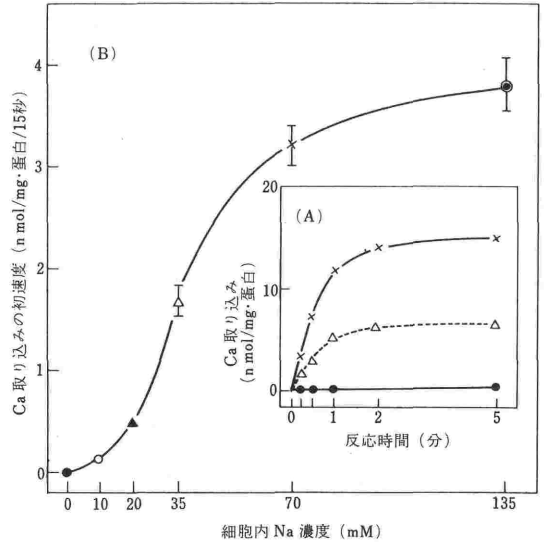


図5 培養ウズラ胚心筋細胞における Ca 取り込みに対する細胞内 Na 濃度の影響 (A)細胞内 Na 濃度が 0(●), 35 mM(△) および 70 mM(X) の心筋細胞への Ca 取り込みの時間経過。(B)Ca 取り込みの初速度(A図の0~15秒間の取り込み量)を細胞内 Na 濃度に対してプロットした。

られると仮定すれば、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度は次式で表されることになる。

$$[Ca^{2+}]_i = [Ca^{2+}]_o \left\{ \frac{(Na^+)_i}{(Na^+)_o} \right\}^3 \exp(-E_m F / RT)$$

ただし [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>: 細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>: 外液 Ca<sup>2+</sup> 濃度, (Na<sup>+</sup>)<sub>i</sub>: 細胞内 Na<sup>+</sup> 濃度, (Na<sup>+</sup>)<sub>o</sub>: 外液 Na<sup>+</sup> 濃度, E<sub>m</sub>: 膜電位, F: ファラデー定数, R: ガス定数, T: 絶対温度を示す。

ウアバイン添加により静止電位はあまり変化しないゆえ、細胞内 Na<sup>+</sup> 濃度がウアバイン添加により2倍上昇すれば、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度は8倍上昇することになり、不整拍動を起こしえよう。

以上の仮説(図2)に従えば、ウアバイン誘発不整拍動のより直接的な原因は、細胞内 Na<sup>+</sup> 濃度の増加ではなく、Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> 交換輸送系を介した Ca<sup>2+</sup> の過剰流入ということになる。前式から、外液 Ca<sup>2+</sup> 濃度を増加させ、外液 Na<sup>+</sup> 濃度を減少させてやれば、細胞内 Na<sup>+</sup> 濃度が増加しなくても細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度は増加し、不整拍動が生じることが予測できよう。実験的にもこのことは確かめられ、Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> 交換輸送系を介した Ca<sup>2+</sup>

の過剰流入と、それに伴う細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の恒常的増加が不整拍動の成因のひとつになっていることが示唆された。しかし、細胞内  $Ca^{2+}$  動態はいま述べた細胞膜の  $Na^+-Ca^{2+}$  交換輸送系以外に、膜電位、細胞膜の  $Ca^{2+}$  チャンネル、細胞膜の ATP 依存性 Ca-ポンプ、細胞膜リン脂質、細胞膜表面層をおおう糖蛋白である glycocalyx、筋小胞体、ミトコンドリアなどにおける巧妙な相互作用のもとに制御されていると考えられており、その実体を知るにはまだほど遠いというのが現状であろう。

## 2. 細胞シートは拍動の安全性の高さを支える

心筋細胞間に存在するギャップ結合は、単に興奮伝達の役割を果たすだけでなく、心臓が不利な環境にさらされた場合にも、できるかぎり秩序ある拍動を維持させるよう機能している。次に、筆者らの細胞培養系を用いた研究を紹介しよう。

マウス心臓から取り出した培養下の1個1個ばらばらの状態の細胞(単一心筋細胞)も、ウアバイン添加により不規則拍動を行なうようになる。不規則拍動を示す単一心筋細胞の割合は、図6の実線で示したように、添加したウアバイン濃度の増加に伴って緩やかな曲線を描いて増加する。このことは、単一心筋細胞の中には、低濃度のウアバインによって不規則拍動を示すようになる細胞もあれば、高濃度のウアバイン存在下においてすら、なお規則正しい拍動を維持できる細胞もあるということ、言い換えれば、単一心筋細胞はウアバイン感受性に関して不均一な集団であるということを示している。

$10^5$  個以上の心筋細胞が互いに接触してできた細胞シートも、ウアバイン添加により不規則な拍動を示すようになる。細胞シートの不規則拍動の様相は、ウアバイン濃度の増加に伴って悪化する。単一心細胞と細胞シートのウアバイン不整脈の反応曲線を比較すると、2つの顕著な違いが認められる。1つは、シートの場合には単一心細胞の場合と異なり、ウアバイン濃度の増加に伴って、不規則拍動を示すシートの割合が急速な立ち上がりを示す曲線を描いて増加すること、もう1つは、およそ40%の単一心細胞が不規則拍動を示す濃度のウアバインの存在下において、細胞シートでは規則正しいリズムの拍動を維持しうること、そして50%以上の単一心細胞が不規則拍動を示すウアバイン濃度になってはじめて細胞シートの中に不規則拍動を示すものがわずかに現われるということである。同様の観察は、ウズラ心臓から調製した培養心筋細胞の場合にもみられる。これらの観察は、細胞シートは単一心筋細胞に比べて不規則拍動の状態になりにくいという点で、安全性の高いシステムをつくっていることを示している。

## 3. 正常拍動維持における細胞間ギャップ結合の役割

さて、多細胞シートの安全性はどのような仕組みで維持されているのであろうか。筆者らは、培養系を使ったモデル実験で、シートを構成している細胞のウアバイン感受性が不均一なこと、およびギャップ結合を介した細胞間の  $Na^+$  の拡散に基づくことを明らかにした。以下、この点について紹介したい。

ウアバイン感受性の大きく異なるマウスとウズラの心筋細胞(図7)を混合培養してモザイクシートをつくり、そのウアバイン感受性を検討すると、マウス細胞の割合が増すにつれてウアバイン感受性は低くなった。マウスとウズラ心筋細胞の混合比が1:1のモザイクシートでは、そのウアバイン感受性は単独シートの感受性のほぼ中間になった(図7)。この機構として、次の可能性が考えられよう。すなわち、モザイクシートを構成する心筋細胞のうち、ウズラ由来の心筋細胞は、ある濃度のウアバイン添加により不規則拍動を行なう状態になるが、マウス由来の心筋細胞は、その濃度のウアバイン存在下ではなお正常な拍動ならび

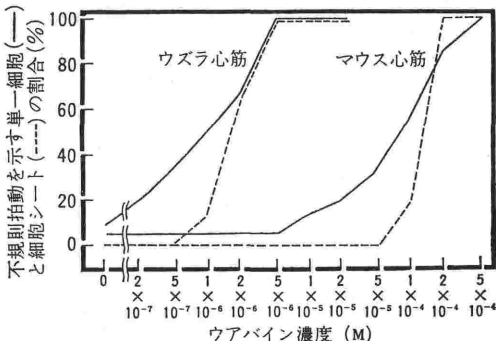


図6 ウアバイン添加により不規則拍動を示す単一心筋細胞ならびに細胞シートの割合

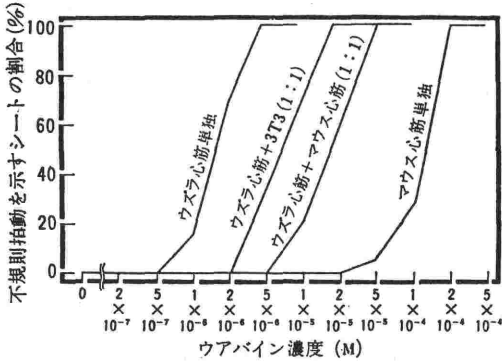


図7 ウズラとマウスの細胞によるモザイクシートのウアバイン感受性

に正常な活動電位の発生が行ないうる。このマウス心筋細胞の発生する正常な活動電位が、ウズラ心筋細胞に伝達され、その結果、ウズラ心筋細胞にも規則正しい拍動が誘発される。

この考えによると、影響を与えるマウス心筋細胞はウズラ心筋細胞と接触しており、ウアバイン感受性が低く、しかも活動電位を出す興奮性細胞に限られることになる。しかし、次の観察は活動電位を出さない非興奮性細胞にもそのような作用がみられることを示している。すなわち、ウズラ心筋細胞と混合する細胞としてマウス 3T3 細胞（マウス由来の株細胞なので、ウアバイン感受性が低くしかも非興奮性の細胞であり、さらに心筋細胞との間に低抵抗接合をつくることのできる細胞である）を用いてみると、図7に示したように、3T3 細胞と接触したウズラ心筋細胞は、ウアバインによる不規則拍動を生じにくくなった。一方、ニューロブラストーマ細胞（マウス由来の株細胞であるため、ウアバイン感受性は低い、心筋細胞との間に低抵抗接合をつくることのできない細胞）や、FL 細胞（心筋細胞との間に低抵抗接合をつくることはできるが、ヒト由来の株細胞なので、ウアバイン感受性は高い）には、3T3 細胞のように、ウズラ心筋細胞のウアバイン感受性を低くする作用はみられなかった。

では、ウズラ心筋細胞の拍動に対し、どのような機構によりマウス細胞は影響を及ぼすのであろうか。

図4に示すように、 $5 \times 10^{-6}$  M のウアバイン添加により、ウズラ心筋細胞シートでは、顕著な細胞内  $\text{Na}^+$  濃度の増加が見られるが、マウス心

筋細胞内の  $\text{Na}^+$  濃度は変化していない。また、図10に示したように、 $5 \times 10^{-6}$  M のウアバインの添加により、ウズラ心筋細胞シートは不規則拍動を行なうようになるが、マウス心筋細胞シートならびにウズラとマウス心筋細胞が 1 : 1 の割合で混合されてきたモザイクシートでは、不規則拍動は生じない。では、そのモザイクシートにおいて、 $5 \times 10^{-6}$  M のウアバイン添加により細胞内  $\text{Na}^+$  濃度はどのように変化するのであろうか。もし、1つのモザイクシート内のウズラとマウスの心筋細胞が互いに相互作用なしにウアバインに対して反応したとすると、モザイクシートの細胞内  $\text{Na}^+$  濃度は、図4-Cの破線のように、ウズラならびにマウス心筋細胞の単独培養の中間値になるはずである。しかし、実験値はその中間値よりもはるかに低く、マウス心筋細胞のほうにより近いことを示している。この現象は次のイオン機序を考えれば容易に説明できる。

モザイクシートに  $5 \times 10^{-6}$  M のウアバインを添加すると、ウアバインはウズラ心筋細胞の  $\text{Na}^+$ -ポンプを阻害し、その結果、ウズラ心筋細胞内の  $\text{Na}^+$  濃度が増加する。しかし、マウス心筋細胞の  $\text{Na}^+$ -ポンプは正常である。ウズラとマウス心筋細胞間にはギャップ結合が形成され、ここでは  $\text{Na}^+$  はかなり自由に拡散しうるので、ウズラ心筋細胞内で増加した  $\text{Na}^+$  は、マウス心筋細胞内へ拡散していく。マウス心筋細胞の  $\text{Na}^+$ -ポンプは正常に作動しているので、入ってきた  $\text{Na}^+$  を細胞外へ汲み出すことができる。その結果、モザイクシート全体の細胞内  $\text{Na}^+$  濃度は低く保たれ、不規則拍動を生じることはないというわけである。また、同じ動物の心臓から調製した心筋細胞においても、ウアバイン感受性は不均一であり、ウアバイン添加によりウアバイン感受性の高い心筋細胞内の  $\text{Na}^+$  濃度が増加するが、低抵抗接合部を横切ってその  $\text{Na}^+$  はウアバイン感受性の低い心筋細胞内に流入し、その  $\text{Na}^+$ -ポンプを使って  $\text{Na}^+$  を細胞外に汲み出す。その結果、細胞集団全体の細胞内  $\text{Na}^+$  濃度は低く保たれ、不規則拍動を生じることはないというわけである。

以上の観察は、心筋細胞間に形成された低抵抗接合部が、単に興奮伝達の間として働くだけでなく、 $\text{Na}^+$  などのイオンが自由に細胞間を往来できる場を提供することにより、心臓にとって不都

合な状況である不規則拍動になりにくくするというので、心臓がより安全に規則正しい拍動を続けることができるように働いていることを示している<sup>5)</sup>。

#### 4. ギャップ結合形成による培養心筋細胞シートの拍動リズムの安定化作用

生体内の心臓は規則正しいリズムで拍動しているが、健康なヒトでもそのリズムには約5%のゆらぎがあり、このゆらぎは生体にとってはむしろ好ましいものと考えられている。一方、培養心筋細胞シートにおいては、正常培養下では規則正しいリズムで拍動するが、生体心臓でみられたゆらぎは培養心筋細胞でも存在するのであろうか。図8の結果は、縦軸に拍動から次の拍動までに要した時間の平均値(100とする)に対する%標準偏差を、横軸に集団を形成している心筋細胞数をそれぞれ対数目盛りで示した。マウス心臓より取り出した培養下の、1つ1つばらばらの状態の単一分離心筋細胞では、標準偏差は高値(20%程度)を示している。これに対して、ギャップ結合を介して細胞が集団を形成するにつれて、ゆらぎの標準偏差は低下してくる。このようにして得られた点をつなぎあわせると、傾きが-0.46の直線となり、すなわち、 $1/\sqrt{\text{細胞数}}$ の割合で集団を形成する細胞の数が増加するとともにゆらぎが減少していることがわかる。しかしながら、細胞数が約 $10^4$ 個という多細胞シートを形成してもゆらぎは決して0になることはなく、これらの結果は生体内の心臓と同様に、心筋培養系でもゆらぎを再現できることを示すものと考えられる。また、多細胞形成に伴うゆらぎの減少は、ギャップ結合を形成できない株細胞との心筋混合培養系では認められないことから、心筋どうしのギャップ結合

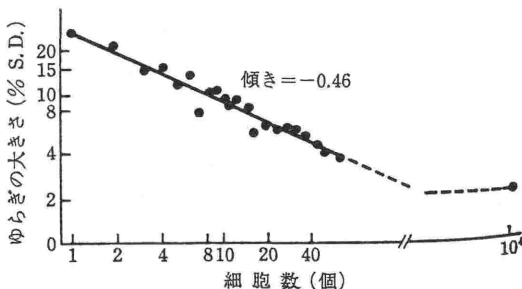


図8 多細胞系ギャップ結合形成に伴うゆらぎの減少

形成が重要な働きを果たしていると思われる。

以上の結果は、心筋細胞間のギャップ結合が規則正しい拍動リズムを保持し、しかも心筋細胞全体として機能するうえで、より安全性の高いシステムを作っていることを意味している。

#### 5. トランスジェニックマウス心房由来 AT-1 細胞

最近、がん遺伝子 SV<sub>40</sub>-T antigen 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスでは、右心房にがんが形成され、それらを皮下に移植してできたがんを培養することにより、分裂能を有する培養心筋細胞を得られるようになった。機能的にも構造的にも心筋特有の性質を保持していると報告されており、従来まで困難であった心筋の分化や増殖の機構を研究するうえでも大変役立つモデルが樹立された<sup>6)</sup>。

#### 文 献

- 1) 岡本正志, 紀氏健雄, 栗本英治他: 筋細胞, 新生化学実験法18 (日本生化学会編), 細胞培養技術, 東京化学同人, 東京, 178-183頁, 1990.
- 2) 岡本正志, 山口知己, 紀氏健雄他: 骨格筋・心筋細胞, 代謝, 中山書店, 東京, 81-95頁, 1992.
- 3) Goshima, K. and Wakabayashi, S.: Involvement of an Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange system in genesis of ouabain-induced arrhythmias of cultured myocardial cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 13:489-509, 1981.
- 4) Goshima, K. and Wakabayashi, S.: Inhibition of ouabain-induced increase in Na content of cultured myocardial cells by quinidine and procainamide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 224: 239-246, 1983.
- 5) Goshima, K. and Wakabayashi, S.: Inhibition of ouabain-sensitive myocardial cells (quail) by contact with ouabain-resistant cells (mouse) and its mechanism. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 13:75-92, 1981.
- 6) Delcarpio, J. B., Lanson, N. A., Friedl, L. J. et al.: Morphological characterization of cardiomyocytes isolated from a transplantable cardiac tumor derived from transgenic mouse atria (AT-1 cells). *Circ. Res.* 69:1591-1600, 1991.