

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659205

研究課題名（和文） コスタメア特異的機能阻害による心筋収縮帯形成

研究課題名（英文） Functional inhibition of the cardiac costamere induces the formation of contraction bands

研究代表者

高松 哲郎（Takamatsu Tetsuro）

京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40154900

研究成果の概要（和文）：心筋が虚血後に再灌流障害を受けると、アクチン・ミオシンの過収縮からなる収縮帯を伴う特徴的な壊死が生じる。本研究では、コスタメア構成分子である  $\beta$ ジストログリカン ( $\beta$ -DG) の局所的機能破綻が収縮帯形成の重要な役割を演じているとの仮説を立て、これを検証するために  $\beta$ -DG-EGFP とアクチン-RFP とを同時に発現させたラット初代培養心筋細胞を作成、心筋細胞膜上の EGFP 蛍光に対して近赤外超短パルスレーザーによる多光子励起分子機能阻害を施した。これにより細胞膜上に発現する  $\beta$ -DG の選択的破綻が、心筋細胞の収縮帯の形成に寄与することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Contraction band (CB) necrosis, a key morphological hallmark of ischemia-reperfusion injury, is caused by regional contracture at individual sarcomeres of cardiomyocytes. However, mechanisms for CB formation remain undetermined. We hypothesized that regional ablation of  $\beta$ -dystroglycan ( $\beta$ DG) leads to genesis of CBs at the ablated sites. To address this possibility, we applied multiphoton (MP) excitation-evoked CALI (Tanabe *et al.*, *Nat Methods* 2005) to neonatal rat hearts transfected with cDNA encoding the protein fused with EGFP ( $\beta$ DG-EGFP), where EGFP fluorescence was homogeneously distributed along the cell membrane. MP-excitation of DG-EGFP at a localized area of interest resulted in instantaneous bleach of EGFP, followed by progressive and localized aggregation of actin filaments at the site of irradiation, consistent with CBs. In summary, regional ablation of  $\beta$ DG resulted in formation of CB, suggesting an essential role of this protein in formation of CBs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：心筋、収縮帯、コスタメア、 $\beta$ ジストログリカン、多光子 CALI

### 1. 研究開始当初の背景

心筋が虚血後に再灌流障害を受けると、アクチン・ミオシンの過収縮からなる収縮帯を伴う特徴的な壊死を生じる。その成因として、 $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交換機構を介する細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$ 過負荷が考えられている (図 1)。

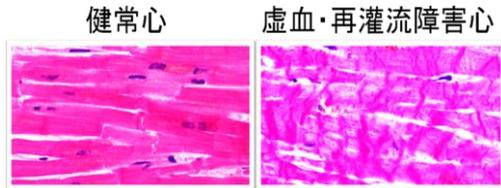


図 1 健常心および虚血・再灌流障害心の組織像。後者の心筋には収縮帯を認める (ヘマトキシリン・エオジン染色)

しかし我々の研究グループが独自開発した高速共焦点レーザー顕微鏡による心臓の細胞レベルでの  $\text{Ca}^{2+}$ 動態解析では、心筋を  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交換機構を介して  $\text{Ca}^{2+}$ 過負荷にしても収縮帯は形成されないことに気がついた (図 2)。つまり、細胞全体に生じる  $\text{Ca}^{2+}$ 過負荷のみでは、収縮帯形成は説明できず、虚血・再灌流障害を受けた心筋では、 $\text{Ca}^{2+}$ 以外の何らかの要因が収縮帯形成に関わっていると考えた。

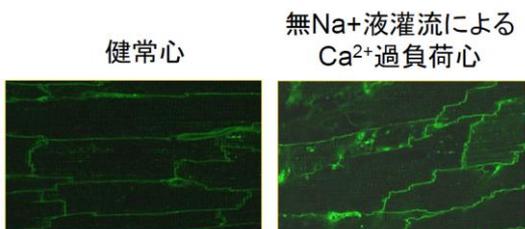


図 2 無  $\text{Na}^+$ 灌流により  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交換機構を介して心筋を  $\text{Ca}^{2+}$ 過負荷にしても収縮帯は形成されない (di-4-ANEPPS による細胞膜の蛍光共焦点画像)

そこで我々は、サルコメアと細胞外基質をつなぐコスタメアに着目し、その構成タンパクの脱落・破綻が収縮帯形成の本質であると考えた。コスタメアは、収縮タンパクであるアクチンと細胞外基質の機械的連結を担うことから、 $\text{Ca}^{2+}$ 過負荷と相まってコスタメアが破綻し過収縮すれば、サルコメア単位での収縮帯の形成が説明できる。実際、免疫組織化学的解析を行ったところ、収縮帯部の細胞膜の  $\beta$ ジストログリカン ( $\beta$  DG) の脱落を観察している (図 2)。

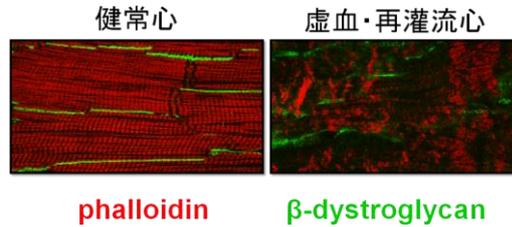


図 3 健常心および虚血・再灌流障害心の免疫染色 (緑:  $\beta$  DG、赤: ファロイジン)

そこで、我々は、細胞外基質とサルコメア (筋束) を繋ぐコスタメア蛋白質の接合部の破綻、特に  $\beta$  DG の破綻が収縮帯の形成に寄与すると仮説を立てた (図 4)。

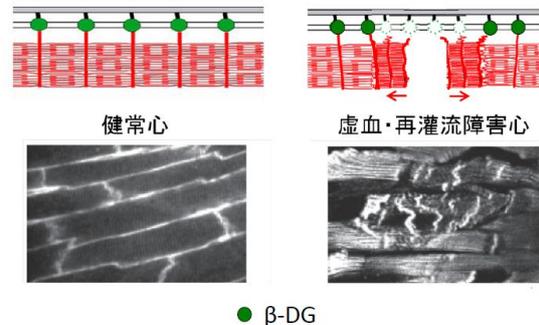


図 4 本研究の仮説 ( $\beta$  DG の破綻が収縮帯の形成に寄与するのではないか)

### 2. 研究の目的

本研究では、 $\beta$  DG 分子の局所的機能破綻が収縮帯形成の原因になるとの仮説を検証するため、多光子励起標的分子機能阻害法 (Chromophore-Assisted Light Inactivation, 多光子 CALI) (Tanabe *et al.*, *Nat Methods*, 2005) を用いて、 $\beta$  DG の特異的機能阻害による収縮帯形成の再現を試みることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 心筋細胞単離と培養

生後 2 日の Wistar ラットの心室筋を、コラゲナーゼを用いて分散させ、約  $5.0 \times 10^5$  個の心筋細胞を f 35 mm のガラスベースディッシュに播種した。

#### (2) 遺伝子導入

単離した心筋細胞を 2 日間培養後、緑色蛍光タンパク (EGFP) 融合ジストログリカン (DG-EGFP) プラスミド (Chen *et al.*, *Biochem J*, 2003) をリポフェクション法により遺伝子導入した。

心筋細胞アクチンのマーカーとして、赤色

蛍光タンパク (RFP) 融合 lifeact (Lifeact-RFP) プラスミドを (Riedl *et al.*, *Nat Methods*, 2008) リポフェクション法により、合わせて遺伝子導入を施した。

### (3) 多光子 CALI

共焦点レーザー顕微鏡 (Mai-Tai Ti: Sapphire tunable laser 搭載) (LSM 510 META NLO, Zeiss) を用いて、下記の条件で、2 光子励起を施した (Tanabe *et al.*, *Nat Methods*, 2005)。

- ・波長: 850 nm
- ・パルス幅: 100 fs
- ・繰り返し頻度: 76 MHz
- ・対物レンズ: x63 N/A 1.4
- ・レーザー照射: 4.5-8.5 MW/cm<sup>2</sup>
- ・ピクセル照射時間: 1.61 μsec
- ・スキャン領域: 7 μm x 1.4 μm
- ・スキャン時間: 81 msec

## 4. 研究成果

心筋細胞膜上の DG-EGFP 発現領域の局所に多光子励起反応を起こすことによって、EGFP は直ちに褪色、これに伴ってアクチン RFP が凝集し、収縮帯様変化を呈した。(図 5)。

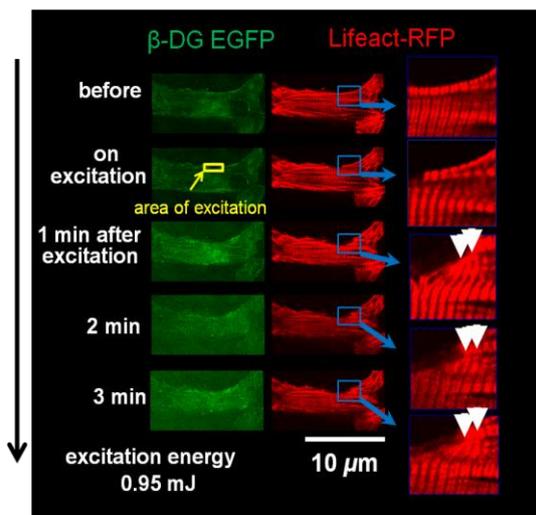


図 5 心筋細胞膜上の DG-EGFP 発現領域の局所における多光子励起反応とその後の細胞の状態。EGFP は直ちに褪色、これに伴ってアクチン RFP が凝集し、収縮帯様変化を呈した。

一方、EGFP 単独発現心筋細胞および EGFP 非発現心筋細胞においては、DG-EGFP 発現心筋細胞より高い照射エネルギーを与えても、変化が認められなかった (図 6、7)。

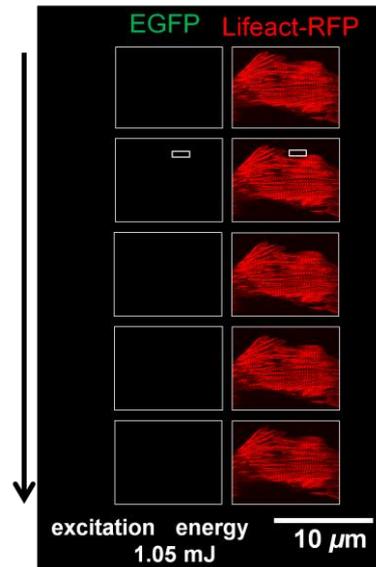


図 6 EGFP 発現しない心筋細胞への局所における多光子励起反応とその後の細胞の状態 (アクチン RFP の凝集は認められなかった)

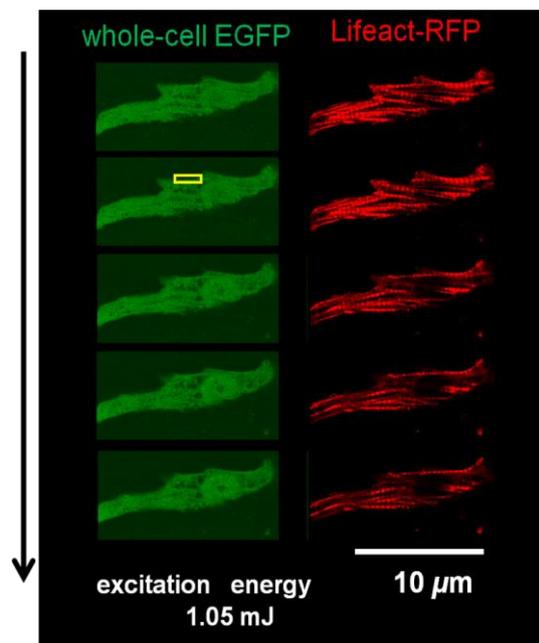


図 7 EGFP 非特異的発現心筋細胞への局所における多光子励起反応とその後の細胞の状態 (非特異的 EGFP 発現細胞に施しても収縮帯は形成されにくい)

種々のエネルギーのレーザー照射を行い収縮帯の形成率を求めたところ、非特異的 EGFP 発現心筋細胞では、収縮帯形成は認めなかったのに対し、DG-EGFP 発現心筋細胞では 0.95mJ を閾値としてエネルギー依存性に収縮帯形成率が高まった。これらの結果より DG-EGFP 発現心筋細胞は、非特異的 EGFP 発現心筋細胞に比して収縮帯を起こしやすいことが明らかとなった (図 8)。

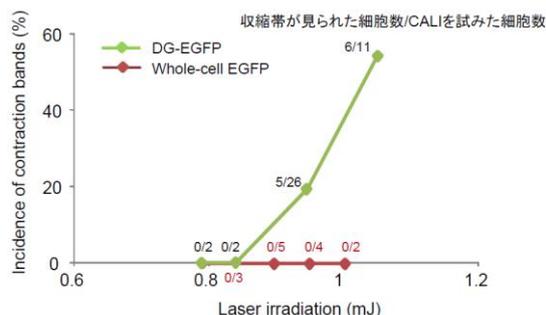


図8 照射エネルギー量と収縮帯発生率

多光子 CALI を用いることによって、細胞膜上に発現する  $\beta$ -DG を破綻させることにより心筋細胞の収縮帯が形成されることが示された。本研究の結果は、心筋の収縮帯形成の機序としてこれまで広く受け入れられてきた細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  過負荷に加えて、アクチンと細胞外基質を繋ぐコスタメアの関与を示唆するものであり、心筋の収縮帯壊死の発生機構を考える上で重要な知見と考える。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Yamaoka Y, Nambu M, Takamatsu T. Fine depth resolution of two-photon absorption-induced photoacoustic microscopy using low-frequency bandpass filtering. *Optics Express*. 19: 13365-13377, 2011. (査読有)
2. Matsuyama T, Tanaka H, Adachi T, Jiang Y, Ishibashi-Ueda H, Takamatsu T. Intrinsic left atrial histoanatomy as the basis for reentrant excitation causing atrial fibrillation/flutter in rats. *Heart Rhythm*. *in press*. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

1. 高松哲郎 「生体イメージングと分光」 日本顕微鏡学会バイオメディカルニューマイトロスコピー分科会平成 23 年度シンポジウム講演会 (招待講演) 2012 年 3 月 東京都
2. 高松哲郎 「無標識分子イメージングを用いた病態の可視化」 第 89 回日本生理学会大会組織化学連携シンポジウム (招待講演) 2012 年 3 月 松本市
3. Tanaka H, Tanabe T, Adachi T, Takahashi M, Yamaoka Y, Dai P, Takamatsu T.

Multiphoton excitation-evoked CALI for understanding cardiac pathophysiology. 14th International Congress of Histology and Cytochemistry (招待講演) 2012 年 8 月 京都市

4. Takahashi M, Tanaka H, Adachi T, Yamaoka Y, Dai P, Takamatsu T. Demonstration of contraction-band formation by multiphoton. 14th International Congress of Histology and Cytochemistry. 2012 年 8 月 京都市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高松 哲郎 (Takamatsu Tetsuro)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40154900

(2) 研究分担者

該当なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

田中 秀央 (Tanaka Hideo)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60236619