

令和元年6月11日現在

機関番号：12612

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19897

研究課題名(和文) 生体内で筋線維タイプを同定するバイオイメージング技法の開発

研究課題名(英文) Evaluation of skeletal muscle fiber type using photothermal microscopy

研究代表者

狩野 豊 (Kano, Yutaka)

電気通信大学・大学院情報理工学研究科・教授

研究者番号：90293133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋の筋線維タイプ(速筋、遅筋線維)は、ミトコンドリア分布や形状に異なる特徴を持つ。本研究は組織中に含まれている光吸収性の分子を利用して画像化するフォトサーマル(PT)顕微鏡を用いて、骨格筋線維タイプ別のミトコンドリア特性を明らかにすることを目的とした。観察結果により、ミトコンドリア形状は、遅筋線維では細長い形状が多く見られ、速筋線維では点状の形状が見られた。PT顕微鏡は、未固定、非染色の条件下でミトコンドリアのイメージングを可能にすることから、生体内での筋線維タイプの同定に利用できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋線維(筋細胞)は大きく速筋と遅筋に分類され、神経系や代謝的な特長が決定される。骨格筋研究において、筋線維タイプを分類することは基礎的な生体情報として重要である。これまで、筋線維タイプを生きたまま生体内で分類する方法は開発されていなかった。本研究はフォトサーマル(光熱変換)顕微鏡法によって、線維タイプ別にミトコンドリア含有量や形態特性の違いを評価することに成功し、速筋と遅筋線維を生体内で同定することが可能であることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Different fiber types of skeletal muscle (fast-twitch/slow-twitch) have different characteristics of mitochondrial distribution and its shape. Photothermal (PT) microscopes are imaged utilizing light absorbing molecules contained in tissue. In this study, we attempted to evaluate muscle fiber type from morphological characteristics of mitochondria using PT microscope. The PT imaging luminance values of SDH stained and unstained in slow muscle fibers were higher than those of fast muscle fibers. Slow muscle fibers showed many elongated mitochondrial shapes. On the other hand, the dotted mitochondrial shapes were seen in fast muscle fibers. These features were also confirmed in untreated muscle samples without muscle tissue fixation. Our original PT microscopic observation was shown to allow mitochondrial imaging in untreated muscle tissue samples.

研究分野：運動生理学

キーワード：骨格筋 筋線維タイプ ミトコンドリア フォトサーマル顕微鏡法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋線維(筋細胞)はミオシン重鎖(MHC)のアイソフォームの違いによって速筋と遅筋に分類できる。この筋線維タイプは、筋収縮の動員パターン(運動神経制御)、収縮特性(収縮速度)、代謝特性(エネルギー産生)の違いを伴っている。したがって、筋生理学の研究において、筋線維タイプの分類は最も重要で基礎的な生体情報である。しかしながら、現在、筋線維タイプを生きたまま生体内で分類する方法は開発されていない。本研究は、これまで独自に開発を進めてきた *in vivo*(生体内)バイオイメージング研究を基盤として、フォトサーマル(光熱変換)顕微法による筋線維タイプ同定法の確立に挑戦する。

2. 研究の目的

本研究は、フォトサーマル顕微法を応用し、生きた状態の筋線維に前処理を施すことなく、レーザー光を照射することによって、リアルタイムに筋線維タイプを同定する新技術確立することを目的としている。この技術は、培養細胞への適応から、さらに個体レベルの筋細胞研究への導入が期待できる。本研究では、はじめに筋線維タイプで異なる特性を示すミトコンドリア形態を手がかりとして、筋線維タイプの同定を試みた。

3. 研究の方法

フォトサーマル顕微法は分子の光熱信号を高感度で検出する光学測定法である。現在のバイオイメージング技術は蛍光イメージング法を基盤にしたものである。その一方、フォトサーマル顕微法によるバイオイメージングは理論的には確立されているものの、複数の半導体レーザーによる波長のコントロールや検出方法の多様性から、生きた細胞への応用が進んでいない。しかしながら、この萌芽的な技法の高感度特性および波長選択性により、筋細胞内のミトコンドリアや収縮タンパクの光熱信号特性を同時に評価できる可能性がある。本研究は、速筋線維と遅筋線維によるフォトサーマル信号の特異性を見いだすことである。そのため、2つの研究手法 (*in vitro*, *in vivo*)を考案した。

被験動物: 本実験では、31週齢の雄性 C57/BL6J マウス(日本エスエルシー株式会社)と同週齢の PGC-1 過剰発現モデルマウスを用いた。すべてのマウスは、室温 23 ± 2 および湿度 $55 \pm 10\%$ を維持し 12 時間の明暗サイクルに管理された飼育室において、餌と水を自由に摂取できる状態で飼育した。すべての実験は本学動物実験委員会の承認を得たものであり、動物実験指針に沿って行った。

(1) *In vitro* 実験

従来の組織化学手法による筋切片をスライドガラス上で観察する光学顕微鏡観察とフォトサーマル顕微法を組み合わせることによって光熱反応の特性を筋線維タイプ毎に評価した。麻酔下でマウスの前脛骨筋(TA)を摘出した。摘出後は凍結組織包埋剤(O.C.T コンパウンド 4583: SAKURA)を用いて液体窒素により冷却したイソペンタンにて急速凍結し、 -80 で保存した。クリオスタット(CM1950, Leica)によって -20 下で $10 \mu\text{m}$ の横断薄切標本作製した。明視野画像と PT 画像の両方による筋線維構造を観察するために一部の試料にコハク酸脱水素酵素(SDH)染色を行った。横断薄切標本を 0.2 M リン酸緩衝液(pH 7.5) 2.5 ml , 0.2 M コハク酸ナトリウム水溶液 2.5 ml , ニトロブルーテトラゾリウム 5 mg の混合液中で、 37 , 45 min インキュベーションを行った。その後蒸留水で洗浄し脱水処理を行った後、封入剤(マウントクイック, 大道産業)で封入した。

フォトサーマル顕微鏡: Fig.1 にフォトサーマル顕微鏡の概要図を示した。励起波長はシトクロム c の吸収ピーク(高橋 & 増田, 2009)に近い 520 nm , 検出波長は生体透過性が高い 785 nm (Wu et al., 2009) のレーザを使用し、ロックイン検出用の信号発生器 Rigo1, DG4162) を使用して、励起光レーザからの出力波形を 100 kHz に周波数変調した。次に、2つのレーザビームをダイクロイックミラーで1つに集約し、対物レンズ(倍率 $40\times$ 開口数 0.95) を介して試料上に照射した。励起によって発生した PT 効果によってプローブ光強度が変化し、その変化量が信

号となり，それをコンデンサレンズで収集し，自動バランス検出器（Newfocus，Nirvana）で検出した．検出光信号をロックインアンプ（Signal Recovery，モデル 7270DSP）に導入した．

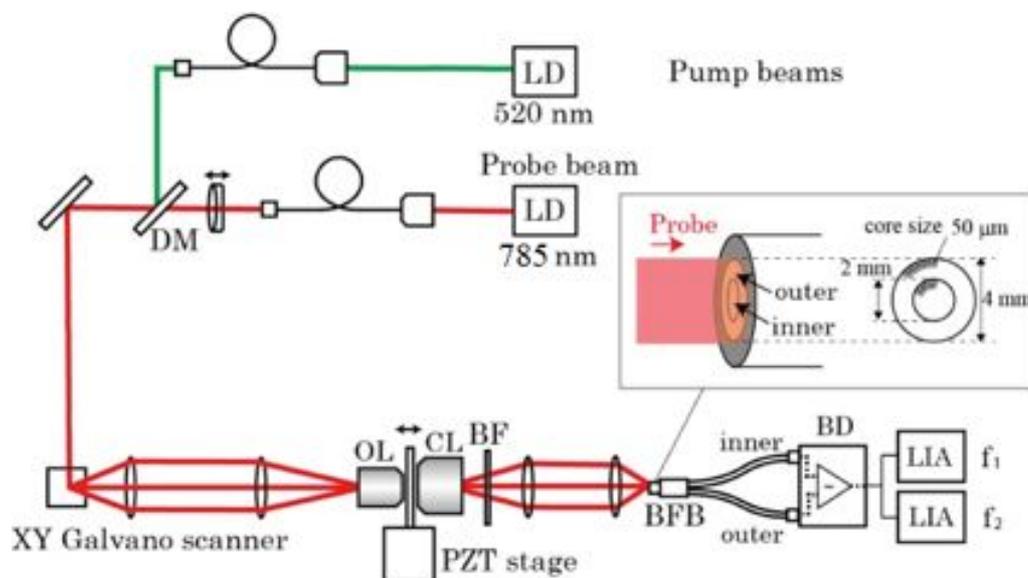


Fig. 1 フォトサーマル顕微鏡概要図 (Miyazaki *et al.*, 2016 を参照) LD: レーザダイオード, DM: ダイクロミックミラー, OL: 対物レンズ, CL: コンデンサレンズ, BF: バンドパスフィルタ, BFB: 2分岐ファイバーバンドル, BD: 自動バランス検出器, LIA: ロックインアンプ

画像解析：本実験では PT 画像において，筋線維の平均シグナル強度と内部形状の長さを測定した．すべての画像解析は ImageJ 1.51s を用いた．平均シグナル強度について，Fig.2 のように線維の概形を囲み，その範囲にあるピクセルの輝度値を平均し求めた．内部形状の長さについて，形状を楕円と見なし長径と短径および楕円率を算出した．

統計処理：本実験における統計量は，平均値 \pm 標準誤差 (SE) として示した．すべての統計処理は Prism ver.7.02 (GraphPad Software) を用いた．5%未満の危険率を有意水準とした．

(2) *In vivo* 実験：生きたままの個体（小動物）を麻酔下に置き，*in vivo* バイオイメージング法とフォトサーマル顕微鏡を組み合わせて，筋線維タイプに特異的な信号を検出する．（現在，この実験方法による結果は解析中である）

4. 研究成果

Fig.2 に SDH 染色試料の観察結果を示した．A から濃く染色された線維はミトコンドリア活性が高い酸化系線維である．一方，薄く染色された線維は解糖系線維である．同一切片をフォトサーマル(PT)画像においても，同様な染色強度の違いを認めた．酸化系線維と解糖系線維を拡大すると，内部形状に違いが見られた．酸化系線維では細長い形状が見られたが，解糖系線維では点状の形状が多く観察された．

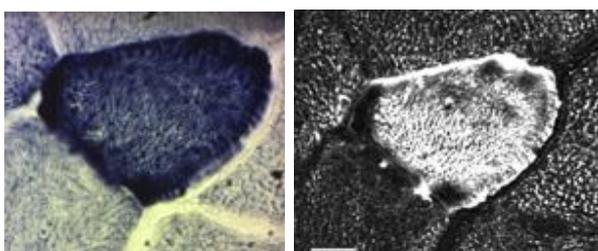


Fig.2 SDH 染色試料の観察画像(左)，PT 画像(右) スケールバー = 10 μ m

無染色試料の観察結果においても，PT 画像では，シグナル強度が異なる 2 種類の線維が観察された。

Fig.3 には，PGC-1 過剰発現モデルマウス無染色試料の観察結果を示した．野生型と同様にシグナル強度が強い線維と弱い線維が観察された。

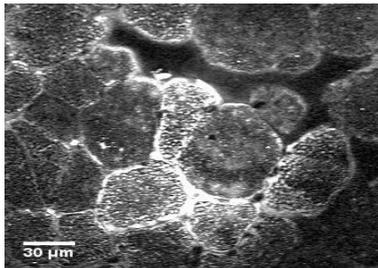


Fig.3 PGC-1 過剰発現モデルマウスにおける無染色切片における PT 画像 スケールバー = 30 μm

Fig.4 に SDH 染色試料を基準として酸化系と解糖系線維に分類した後，PT 画像のシグナル強度の分布，ミトコンドリア形態の長短比とその楕円率を示した．酸化系線維と解糖系線維ではシグナル強度に差が見られ，長径については酸化系線維は有意に長く，楕円率も酸化系線維が有意に高値を示した。

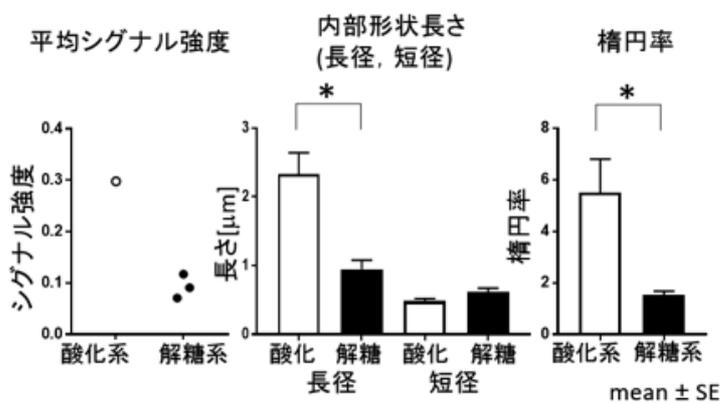


Fig.4 PT 画像による線維タイプ別のシグナル強度，ミトコンドリアの長短比とその楕円率の評価

Fig.5 に PGC-1 過剰発現モデルを対象とした無染色試料の解析結果を示した．シグナル強度の分布を基準として，シグナル強度毎に内部形状長および楕円率を野生型と比較した示した．強シグナルでは，PGC-1 の長径が有意に短く，短径は大きかった．その結果，楕円率は有意に低く，PGC-1 マウスのミトコンドリア形状は球状形態を示すことが明らかになった。

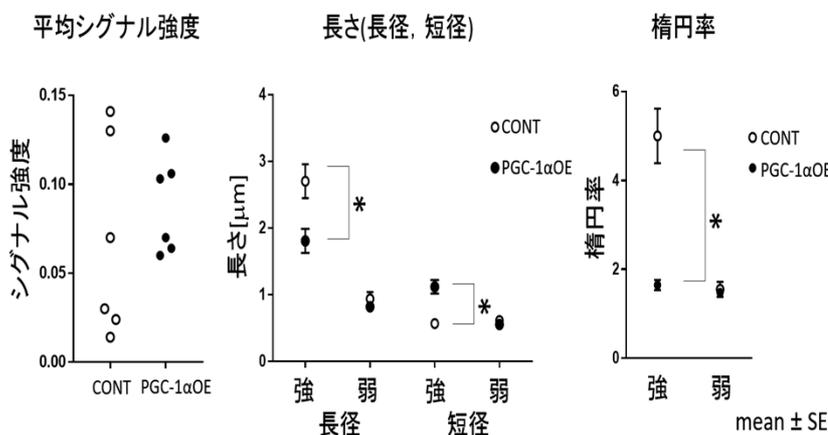


Fig.5 PGC-1 過剰発現モデルの PT 画像によるシグナル強度，ミトコンドリアの長短比とその楕円率の評価

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Photothermal imaging of skeletal muscle mitochondria.

Tomimatsu T, Miyazaki J, Kano Y, Kobayashi T.

Biomed Opt Express. 2017 May 15;8(6):2965-2975. doi: 10.1364/B0E.8.002965. eCollection 2017 Jun 1. 査読有り

〔学会発表〕(計1件)

フォトサーマル顕微鏡を用いた骨格筋細胞内のミトコンドリア形態観察

第73回日本体力医学会 査読有り

田中宏樹, 堀川大空, 中田和明, 小林孝嘉, 狩野豊

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 <http://www.ecc.es.uec.ac.jp/index.html>

6 . 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：小林 孝嘉, 中田 和明, 田中 宏樹

ローマ字氏名： KOBAYASHI Takayoshi, NAKATA Kazuaki, TANAKA Hiroki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。