

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23659116

研究課題名(和文) 生体内ナノイメージングによる細胞ダイナミクスの解析

研究課題名(英文) Analysis of cell dynamics using intravital nano-imaging.

研究代表者

小比類巻 生 (Fuyu, Kobirumaki)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：40548905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腫瘍細胞や心筋・血管平滑筋細胞内の構造タンパク質(-actininやEB1)を取上げ、共焦点顕微鏡を用いたin vivo高速ナノイメージングを駆使して観察と動態解析を行った。その結果、培養細胞および三次元培養系では、微小管伸長速度が温度依存性に上昇することを確認した。また、生きたマウスの心臓においては、単一サルコメア動態を世界で初めて観察することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In vivo nano-imaging have the potential to investigated molecular dynamics and mechanism in living mammals with nanometer accuracy. In this study, in the xenograft tumors, the mean velocity of EB1-comets suggests that the velocity of MT tips in vivo is affected by surrounding microenvironment of the cells by using high-speed (100fps) and high-resolution (~20 nm) confocal fluorescent microscope. Likewise, using the same imaging system, in living heart, we found that the working range of sarcomere length (1.90 and 1.68 μm in diastole and systole, respectively) existed on the shorter resting distribution side, and the left ventricular developed pressure was linearly correlated with the sarcomere length change between diastole and systole on the order of 100 nm.

研究分野：生物物理学

キーワード：in vivoイメージング 微小管 サルコメア

1. 研究開始当初の背景

1) 微小管は非常に動的な細胞内構造体であり、細胞分裂や接着、遊走、細胞内輸送など多くの重要な細胞活動において必須の役割を担っている。微小管プラス端結合因子(MT plus-end-binding proteins)の一種である EB1 は、微小管の伸長端に集積する性質を持つため、伸長する微小管の動態を示す良い指標となる。生体内の細胞の微小管動態を調査することにより、生体内での細胞増殖や細胞遊走などの細胞活動を分子レベルかつ定量的に調べることができると期待される。

2) リズミカルな心筋の収縮・弛緩を起こす力を生み出しているのはアクチンとミオシン ATPase の酵素反応である。この反応がアクトミオシン系を含む超分子構造体であるサルコメアの運動を生じさせ、サルコメアの一斉収縮・弛緩が心筋を拍動させることにより心臓のポンプとしての機能を生じさせている。心筋細胞内のサルコメアにおけるナノレベルの分子反応が個体の血圧や心拍などのマクロレベルの機能に与える影響を調査することにより、心臓の機能を分子レベルから個体レベルまで一貫して理解することができる

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウスを用いて、個体や臓器の「動き」の中から細胞内 1 分子の挙動をナノスケールで測定する技術を完成させ、*in vivo* において細胞内 1 分子の挙動を高時間 (~2 ms)・空間 (~2 nm) 分解能で観察することである。マクロ情報も同期取得し、機能性タンパク質のナノスケールの挙動と個体・組織の機能を融合させる。具体的には、運動性の高い腫瘍細胞や、心筋・血管平滑筋細胞内の構造タンパク質および関連タンパク質(例えば α -actinin や EB1)を取上げ、「動きの仕組み」を、分子レベルから組織・個体レベルまで一貫して理解することを目指す。

3. 研究の方法

1) 研究に使用する実験試料(GFP-EB1 を発現する乳ガン由来細胞株およびその細胞を移植した腫瘍形成マウス)の作成を行う。*In vivo* 観察のためのマウスへのウインドウ形成手術とそれに必要な器具を設計しウインドウ形成手技を確立する。EB1 追跡による *in vivo* 微小管動態観察技術を確立したのち、その技術を使用して、細胞外環境の違いや、抗ガン剤投与時における生体内の細胞における微小管動態の変化を調査した。さらに、EB1-GFP 発現細胞移植による腫瘍を持ったヌードマウスまたは SCID マウス)にタキソールを投与し、生体内で増殖・成長している腫瘍内における EB1-GFP の輝点をリアルタイム観察および解析を行い、抗がん剤投与の微小管動態と細胞移動への影響を調査した。

2) 生きた心臓の心筋細胞のサルコメア長を測定する目的で、アデノウイルス系を用いて Z 線局在タンパク質である α -actinin を GFP 標識し、蛍光顕微鏡を用いてサルコメアの観察を行った。マウス骨格筋からクローニングした α -actinin の C 末端側に GFP を連結した組換え遺伝子をアデノウイルスベクター系に組み込み、発現した組換えアデノウイルスをラットアダルト心筋細胞およびマウス・ラットの各個体に感染させた。 α actinin-GFP を発現したマウスを吸入麻酔と人工呼吸器管理下で開胸し、生体マクロ情報(心電図・左心室圧)を同時に取得しながら *in vivo* イメージングを行い、ナノメーター精度での生体内サルコメア長計測を行った。

4. 研究成果

1) 培養ヒト乳ガン由来 KPL-4 細胞に EB1-GFP を発現させ、伸長する微小管の先端に局在する EB1-GFP の輝点を、共焦点顕微鏡システムを使用して動画を取得。Mark2 プログラム(Ken'ya Furuta 博士開発)により、EB1-GFP 輝点の追跡を行った。その結果、レンズヒーターにより 37 に維持された環境において培養 KPL-4 細胞中の EB1-GFP 輝点の速度(すなわち微小管伸長速度)は平均 379 nm/sec であった。

また、時間に対する EB1-GFP の移動距離は直線状のプロットを示し、細胞内の微小管の伸長速度は部位にかかわらずほぼ一定であることが示された。

2) 細胞外マトリクス試薬(マトリゲル)中で三次元培養を行った KPL-4 細胞でも、微小管ナノイメージングに成功した。37 の環境において三次元培養細胞中の微小管伸長速度は平均 142 nm/sec であった。

3) さらに、ヌードマウスに KPL-4 細胞を移植することで形成した腫瘍内部の細胞内微小管のナノイメージングにも成功した。生きたマウス内に生じた血流のある主要組織中の細胞では、微小管の伸長速度は平均 174 nm/sec であった。また、これらの微小管を血管から離れた細胞の微小管と血管に近い細胞の微小管に分けて分布を取ると、血管から遠い細胞では平均 118 nm/sec、血管に近い細胞では 230 nm/sec と血管に近い方が、2 倍以上速くなっていた。近傍の有無によって微小管伸長速度が異なることから、微小管伸長の温度依存性を調査し、培養細胞および三次元培養系では、実際に微小管伸長速度は温度が高いほど早いことを確認した。

これらの成果を発表するため、現在論文を作成中である。

4) 心筋細胞の収縮装置であるサルコメア動態のナノイメージングを行うため、 α -actinin-GFP 発現するアデノウイルスベクターを作成し、吸入麻酔下のマウスの心筋層に

直接注入することにより、 α -actinin-GFP によって Z 線を標識したマウスを作成した。このマウスを人工呼吸および吸入麻酔下で開胸し、共焦点顕微鏡を用いてナノイメージングを行った。その結果、生きたマウスの心臓において単一サルコメア動態を世界で初めて観察することに成功した。

5) ピクセルごとの輝度を距離に対してプロットし、輝度のピークを数学的にフィッティングすることにより、ピクセルサイズに依存することなく、最も輝度値の高い点を Z 線として、Z 線の移動を高精度で算出可能な解析方法を創出した。この解析により、顕微鏡系の精度は ~ 40 nm であることが判明した (40X レンズ, 100 fps)。また、60X のレンズを用いて 100fps で画像を取得した場合の精度は ~ 20 nm であった。

5)(4) で創出したサルコメア長計測法を用いて、時間経過に対する単一サルコメア長変化を調査したところ、生きた心臓のサルコメア長は、同じ細胞内の隣合ったサルコメアであっても約 300 nm ものバラツキがあることが判明した。また生きた心臓中のサルコメア長は、摘出心臓での弛緩時のサルコメア長と比べて短いことが明らかとなった。これは、生きた心臓中のサルコメアが常に収縮した状態を維持しており、完全な弛緩状態にはなっていないことを示していると考えられた。

6)(5) で算出した時間ごとのサルコメア長をすべてヒストグラムにまとめ、それを 2 ピークガウスフィットすることにより、生きた心臓中のサルコメア長の最大値 (diastole 時) と最小値 (systole 時) を簡便に算出方法を創出した。これにより、13 匹のマウスにおける弛緩時・収縮時サルコメア長とともに、サルコメア収縮率を求めることが可能になった。

7) さらにサルコメアイメージングと同時に取得した左心室圧とサルコメア収縮率の関係を調べたところ、本研究で測定した血圧 40 \sim 100 mmHg の範囲内では、左心室圧とサルコメア収縮率の間には直線的な相関関係があることが明らかとなった。

これらの研究結果は論文にまとめ、現在投稿中である。

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 3件)

小比類巻生、井上天宏、新谷正嶺、大山廣太郎、照井貴子、南沢享、石渡信一、福田紀男. J Physiol Sci. 査読有、64 巻 4、2014、221-232

新谷正嶺、大山廣太郎、小比類巻生、大木大志、石渡信一、福田紀男、J Gen Physiol. 査読有、143 巻 4、2014、513-524

井上天宏、小比類巻生、影本達也、藤井輝之、照井貴子、草刈洋一郎、本郷賢一、森本幸生、大槻磐男、橋本和弘、福田紀男、J Mol Cell Cardiol. 査読有、63 巻、2013、69-78

[学会発表](計 4件)

小比類巻生、高速ライブイメージングを用いたマウス *in vivo* サルコメア動態解析、第 91 回日本生理学会、2015 年 3 月 23 日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

小比類巻生、ナノスケール高速ライブイメージングによる *in vivo* サルコメア計測、第 12 回ナノ学会大会、2014 年 5 月 23 日、京都大学宇治キャンパス(京都府・宇治市)

小比類巻生、高速ライブイメージングを用いた *in vivo* 単一サルコメア計測、第 91 回日本生物物理学会大会、2014 年 3 月 17 日、鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)

小比類巻生、Real-time imaging of sarcomere dynamics in the mouse heart *in vivo*、第 58 回アメリカ生物物理学会大会、2014 年 2 月 19 日、サンフランシスコ(アメリカ合衆国)

小比類巻生、Real-time high-resolution cardiac imaging *in vivo*、第 51 回日本生物物理学会年会、2013 年 10 月 30 日、京都国際会議場(京都府・京都市)

小比類巻生、生きたマウスの心臓における単一サルコメア長解析、第 11 回ナノ学会大会、2013 年 6 月 7 日、東京工業大学(東京都・目黒区)

小比類巻生、Real-time imaging of single sarcomere in the mouse heart *in vivo*、第 90 回日本生理学会大会、2013 年 3 月 27 日、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

小比類巻生、Real-time measurement of sarcomere length in the rodent heart by α -Actinin-GFP、第 49 回生物物理学会年会、2011 年 9 月 18 日、兵庫県立大学姫路書写キャンパス(兵庫県・姫路市)

小比類巻生、 α -Actinin-GFP を用いたアダルト心筋細胞のサルコメア長計測、第 9 回ナノ学会、2011 年 6 月 3 日、北海道大学(北海道・札幌市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小比類巻生 (KOBIRUMAKI, Fuyu)
東京慈恵会医科大学・医学部・細胞生理学講

座・助教

研究者番号：40548905

(4)研究協力者

福田 紀男 (FUKUDA, Norio)

東京慈恵会医科大学・医学部・細胞生理学講座・准教授

研究者番号：30301534

大槻 磐男 (OTSUKI, Iwao)

東京慈恵会医科大学・医学部・細胞生理学講座・客員教授

研究者番号：70009992

照井 貴子 (TERUI, Takako)

東京慈恵会医科大学・医学部・麻酔学講座・助教

研究者番号：10366247

樋口 秀男 (HIGUCHI, Hideo)

東京大学・理学部・物理学専攻・教授

研究者番号：90165093

下澤 東吾 (SHIMOZAWA, Togo)

早稲田大学・生命理工学部・助教

研究者番号：00386608