

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 21 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23790254

研究課題名(和文) In vivo ナノイメージングによる心疾患の病態解析

研究課題名(英文) Single sarcomere imaging in the living heart

研究代表者

照井 貴子 (Terui, Takako)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：10366247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：心臓の心筋線維の最小ユニットであるサルコメアの収縮動態を高い時間・空間分解能でライブイメージング可能となるシステム開発を行い、生体内(in vivo)での心筋収縮・弛緩動態やex vivoシステムを使った様々な条件下での心筋の収縮動態をナノレベルで可視化し、心筋の収縮・弛緩の分子メカニズムを解明するためのシステム構築を行った。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanisms of myocardial contraction in vivo have not been clarified due primarily to technical difficulties. A novel system which allows for real-time single sarcomere imaging in the living heart was developed. First, in order to directly observe sarcomeric contractions from the surface of the heart, Qdots, conjugated with anti- α -actinin antibody, were transfected in the LV under artificial ventilation, allowing us to observe striated patterns ($\sim 2 \mu\text{m}$) along cardiomyocytes. Next, an expression system of GFP- α -actinin with an ADV vector, and injected it into the Left ventricle of the rat. Real time sarcomere imaging becomes possible by high time and the spatial resolution. Furthermore, myocardial contraction and relaxation movement at the various conditions are visualized with circulation device ex vivo. Accordingly, we could successfully image the oscillations of sarcomeres in cardiomyocytes from the surface of the heart.

研究分野：循環生理学

キーワード：心筋 収縮メカニクス

1. 研究開始当初の背景

近代的なイメージング技術、特に GFP やルシフェラーゼを発現させた細胞を個体内で観察する方法はこの 10 年で急速に発展している。循環器研究分野では、2006 年に米国の Tallini らがマウス個体内の心臓において Ca^{2+} 濃度を測定することに成功している^①。しかしながら、これらの研究は細胞全体を観察するものであり、細胞内の分子の動きに着目した研究はなされていない。本研究では、1 分子計測技術を活かして、ラットやマウス個体内の心筋細胞のサルコメア（すなわち、分子集合体）の動きを、高い時間・空間分解能で計測する。*In vivo* イメージングすなわち生きた個体では、コントロール困難なパラメータ・因子（血中 Ca^{2+} 濃度、ペーシングによる心拍数変動、呼吸、血液 etc...）があるほか、蛍光物質などは生体内に投与しては悪影響を来しうするため、これらの系を用いた研究は困難を極める。この点に関し、擬似生体内条件ではあるが、*ex vivo* イメージング装置を用いて研究することで、先述のあらゆる実験系を用いた新たな収縮・弛緩のメカニズム解析が可能になると考えられる。*ex vivo* および *in vivo* イメージング装置を用いて、生体内の心臓収縮期・拡張期における心筋サルコメア動態の解明、収縮・弛緩以外に加えた詳細なサルコメア動態の解明を目指す。

2. 研究の目的

心臓の心筋線維の最小ユニットであるサルコメアの収縮動態を *in vivo* および *ex vivo* でライブイメージングできる技術を開発することで、生体内の心筋収縮・弛緩をナノレベルで可視化し、心筋の収縮・弛緩の分子メカニズムの解明をねらう。

(1) *in vivo* イメージングシステムの構築

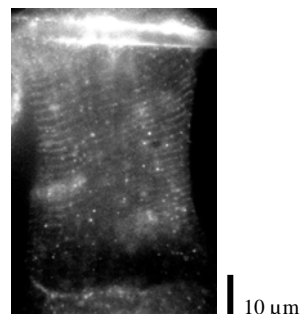
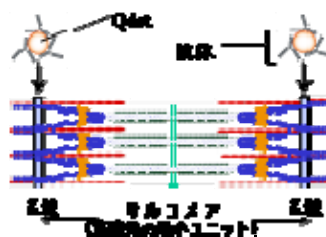
生命科学・医学研究において生体内の様々な制御メカニズムを解明するためには、*in vitro* のみならず *in vivo* での分子メカニズムの解明が待たれるが、心筋研究においては、

心臓自体が常に拍動し続けている臓器であるため、その技術的な難しさから *in vivo* 研究はほとんど行われていない。しかし、近年イメージング技術が急速に発展しており、当研究室でもナノレベルでの分子メカニズム解明が可能となりつつある（図 1）。



<図 1 *In vivo* 心筋イメージング装置>

明るい蛍光（ローダミンの約 1,000 倍）を長時間（最大約 1 時間）発する量子ドット（Qdot）を用いて、心筋サルコメアの Z 線の成分である α アクチニンの抗体と Qdot の複合体をトランスフェクション試薬と混合し、これを単離したラットの心室筋細胞に導入した。その結果、サルコメアのイメージング（Z 線イメージング）を高時間（ ~ 2 ms）・空間（ ~ 5 nm）分解能で行うことに成功している（図 2）。



<図 2 心筋細胞での Qdot 導入像>

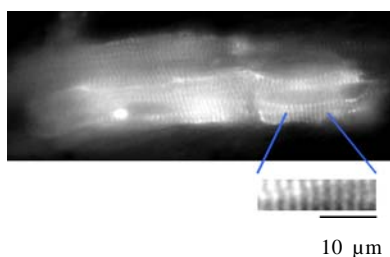
ラットの心臓を深麻酔下に摘出後心筋細胞を単離し、 α アクチニン抗体-Qdot 複合体とトランスフェクション試薬を混合させ、心筋細胞に Qdot を導入し観察した。

(2) *Ex vivo* イメージングシステムの構築
In vitro から *in vivo* イメージングへ研究を進めていく上で、より実質的かつ装置系段階性を持たせて様々な検討を行うため、非常に重要な *ex vivo* イメージング装置の開発を行う。*ex vivo* イメージング装置が確立できると、生体内という条件にかなり近い形での心筋サルコメアの収縮・弛緩動態をイメージングが可能となる。

3. 研究の方法

(1) *In vivo* 心筋ナノイメージング技術の開発：これまでに得られたナノイメージング技術を小動物（ラット、マウス）*in vivo* に応用する。心筋の収縮弛緩の分子メカニズムを明らかにするためには、特定の分子の動きを動物個体内で観察する必要がある。

先述の量子ドットの他、心筋サルコメア、主に心筋線維の Z 線/Z 線付近の *in vivo* イメージングを行うため蛍光タンパク質の生体内発現を検討しており、現在心筋の Z 線/Z 線付近に存在するタンパク質（ α アクチニン）と蛍光タンパク質（EGFP）を融合させた遺伝子組換えウィルスベクターを作製している。遺伝子組換えウィルスベクターを用いて心筋サルコメアに蛍光タンパク質を発現させることにより、より鮮明に心筋サルコメアを蛍光顕微鏡で描出できる。予備試験において、ラット心臓に α アクチニン-EGFP の発現が可能であることが確認できており、今後 *in vivo* イメージングへ応用していく。



<図 4 遺伝子組換えウィルスを用いて蛍光タンパク質を発現させたラット心臓>

EGFP と α アクチニン遺伝子を融合させた遺伝子組換えウィルスベクター（アデノウィルス）を用いてラット心臓に発現させ、深麻酔下に心臓摘出後、観察した。細胞単位で蛍光が認められる他、約 $2 \mu\text{m}$ のサルコメアと思われる横紋構造が認められる。

(2) *Ex vivo* イメージング装置を用いた心筋収縮動態の観察：

一般的に、心臓の心筋収縮自体は、いわゆる心臓のペースメーカー（洞結節）からの心拍により約 1 秒に 1 回の頻度で活動電位が生じ、心臓全体に伝搬する。その伝搬により心筋細胞内の Ca^{2+} イオン濃度が急激に上昇し、心筋細胞が収縮するといわれている。*ex vivo* イメージング装置を用いることにより、その収縮様式について、詳細に観察する。また、 Ca^{2+} イオン濃度変化のない状態での心筋細胞の動態についても検討を行う。

除膜心筋収縮系サルコメアは、 Ca^{2+} 濃度一定の条件下で自発的に振動し（SPOC: Spontaneous Oscillatory Contraction）、その振動数は動物種に固有の心拍数と相関することが報告されている^③。また、心筋細胞に抗 α アクチニン抗体-量子ドット複合体により Z 線をイメージングすることが可能であり、生理的な電気刺激頻度において SPOC に類似した鋸波の振動波形が出現することが判明している^④。細胞レベルで確認されている心筋サルコメアの自励振動（SPOC）が、臓器レベルで確認されるかどうか、*ex vivo* イメージング装置を用いて心筋細胞動態を詳細に観察できる系で検討する。

Ca^{2+} 濃度変化に依存しない心筋細胞動態で、サルコメア長変化が生じるか否かを調べ、心筋収縮における自励振動（SPOC）の存在・意義を明らかにする。

4. 研究成果

(1) *Ex vivo* 心筋ナノイメージング技術の開発：

これまでに得られたナノイメージング技術

を小動物（ラット、マウス）*in vivo* に応用し、生体内での心筋収縮・弛緩のメカニズムの解析を行う予定であるが、その前段階として、ラット摘出心を用いてランゲンドルフ灌流下に顕微鏡観察ができる *ex vivo* イメージング装置を構築した。（図 5）



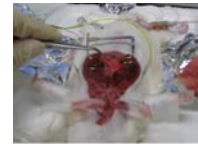
<図 5 *ex vivo* イメージング装置の概要>
上段：灌流装置のポンプ部分。ラット心臓に灌流しながら、蛍光顕微鏡で観察できる。
下段：顕微鏡上で実際に、灌流しながら観察しているラット心臓。拍動を維持している。
心臓へ灌流しながら、顕微鏡観察できるため、灌流条件を変化させた際の心機能の変化を、顕微鏡を通してイメージングが可能となり、今後様々な検討を行うことが可能となった。

(2) ナノイメージング心筋の確立：

心筋サルコメア、心筋の Z 線/Z 線付近に存在するタンパク質（ α アクチニン）と蛍光タンパク質（EGFP）を融合させた遺伝子組換えウイルスベクターを用いて心筋サルコメアに蛍光タンパク質を発現させることにより、より鮮明に心筋サルコメアを蛍光顕微鏡で描出でき、予備試験でもラット摘出心臓組織では可能となっている。

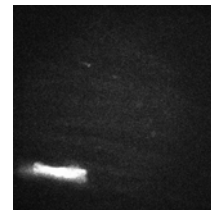
実際に、遺伝子組換えウイルスベクターを用いてラット心臓に α アクチニン-EGFP の発現が可能であることの確認し、*ex vivo* および *in vivo* イメージングに耐えうる組織かどうかの検証を行った。

全身麻酔下に気管挿管し人工呼吸下に開胸したラット（図 6）に対し、ラット心臓の心尖部よりアデノウイルス- α アクチニン-EGFP 複合体を注入し、左心室へ入り大動脈弁を経て冠動脈より血行性に心臓に行き渡らせる。



<図 6 人工呼吸管理下ラット開胸モデル>
気管挿管後、人工呼吸下に開胸したラット。ピンセットで持ち上げているのは心外膜。

48 時間後、アデノウイルス - α アクチニン - EGFP 複合体を注入したラットより深麻酔下に心臓を摘出し、直ちにランゲンドルフ灌流を行い、今回作成した *ex vivo* イメージング装置を使用し、拍動下ラット心臓の観察を行った（図 7）。

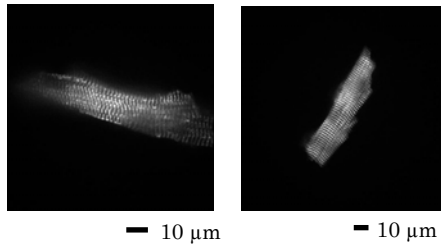


<図 7 *ex vivo* イメージング装置での拍動下観察>

拍動下に α アクチニン - EGFP が発現した心筋細胞を観察（弱拡大）。弱拡大のため、 α アクチニンと思われる構造までは確認できない。さらに、拍動による移動距離が大きく、画面の 3~4 分の 1 ほど拍動に合わせて移動するため、強拡大で確認することは困難であった。

上記のように、強拡大では横紋構造は確認できるものの、拍動による心筋細胞全体の動きには視野が対応できなかった。*ex vivo* および *in vivo* の状態でイメージングを行うには、 α アクチニン-EGFP がラット心筋で発現され、摘出組織 (*in vitro*) ではなく、臓器として保持されたまま、*ex vivo* の状態、すなわち心臓の外表面から観察する形で観察しうるかを確かめる必要がある。これらを確かめるため、収縮タンパク質系へほとんど影響を与えずに、筋収縮を減弱させる BDM (2,3-butanedione monoxime) を使用した。BDM を *ex vivo* 灌流装置でラット心臓に灌流させ、心筋の収縮を弱くすることで心拍動を可逆的に弱くし、強拡大で α アクチニン-EGFP がラット心臓に発現

していることを確認した (図 8)。

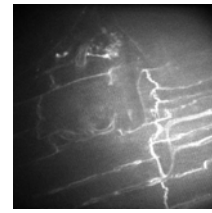


<図 8 *ex vivo* イメージング装置での観察>
心静止下に α アクチニン - EGFP が発現した心筋細胞を観察 (強拡大)。心筋細胞単位で発現しており、 α アクチニンの横紋構造が確認できる。

今回、BDM を使用し心収縮を抑えた状態で観察を行ったが、今後、*in vivo* でのイメージングを行っていくためには、心拍に合わせて、蛍光顕微鏡の焦点を合わせる必要がある。心臓内の心筋細胞の X、Y、あるいは Z 軸方向の動きに合わせて、フィールドバック機構などを顕微鏡に組み込む必要があると考えられた。

(3) 膜電位感受性色素を用いた心筋イメージング :

膜電位感受性色素は、細胞膜の電位変化に応じて吸光および蛍光の変化を来す色素であり、近年様々な領域の研究で用いられている。心筋細胞では、細胞膜すなわち T 管に集積し、その T 管は心筋サルコメアの Z 線に非常に近く存在しているため、サルコメア構造の解析にも広く用いられている^⑤。*ex vivo* イメージング装置を用いて、膜電位感受性色素により、サルコメア構造のイメージングを行い、心筋細胞の収縮様式の詳細、また、 Ca^{2+} イオン濃度変化のない状態での心筋細胞の動態についての検討を行った。深麻酔下にラット心臓を摘出し、直ちにランゲンドルフ灌流を行い、*ex vivo* 灌流装置でラット心臓を用いたイメージングシステムを確立させたのち、拍動下に膜電位感受性色素である di-4-ANEPPS を使用し、T 管に取り込まれイメージング可能かを検討した (図 9)。



<図 9 膜電位感受性色素による

T 管イメージング>

di-4-ANEPPS をラットの *ex vivo* 心臓に灌流し、蛍光顕微鏡で観察。心筋細胞が個々に観察され、さらに横紋構造のように蛍光が観察できる。

膜電位感受性色素を用いて T 管イメージングによる心筋サルコメアイメージングは可能であり、*ex vivo* イメージング装置を用いて、心筋の収縮様式の詳細、また、 Ca^{2+} イオン濃度変化のない状態での心筋細胞の動態についても検討できることが示唆された。

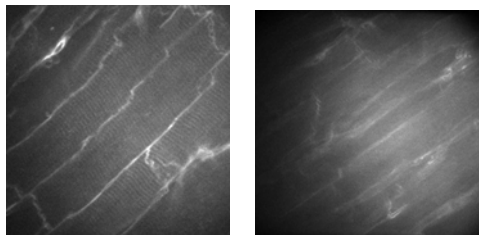
(4) *ex vivo* イメージングシステムを用いた心静止から拍動までの心筋細胞観察 :

細胞レベルで確認されている心筋サルコメアの自励振動 (SPOC) が、臓器レベルで確認されるかどうか、心筋収縮における自励振動 (SPOC) の存在・意義を明らかにするため、*ex vivo* イメージング装置を用いて検討を行った。

Ca^{2+} 濃度変化に依存しない心筋細胞動態で、すなわち、拍動が存在しない条件 (心静止) で、サルコメア長変化が生じるか否か、検討するため、臨床的に一時的に心拍を抑え、心静止とし、不整脈診断にも用いられる ATP (アデノシン三リン酸; Adenosine triphosphate) を使用した。ATP は脱リン酸化されアデノシンとして作用し、心臓の房室伝導を抑制し、心拍を停止することが可能である。また半減期が非常に短く (約 10 秒)、速やかに失活されるため、可逆的な心静止の状態を得ることができる。

深麻酔下にラットより心臓を摘出し、直ちにランゲンドルフ灌流を行い、*ex vivo* イメージングシステムを構築し、拍動下に ATP 0.1 mg を急速投与し、心静止とさせ、心拍が再開されるまでの間、心筋サルコメアに収縮など

が観察されるかどうか検討を行った (図 10)。



<図 10 ATP 使用直後の心筋細胞の観察>
心静止後より心筋細胞の揺れが認められた。サルコメアの動きの蛍光残像が、一部確認することができる。その後、拍動再開したが、拍動下の収縮とは全く異なる心筋細胞個々の動きであった。左：ATP 使用直後の心静止しているラット心臓、右：ATP 使用後、心拍再開する前の心筋細胞が不均一に収縮し、自励振動のようにみられる様子

心静止より拍動再開するまでの間にサルコメアの動きは観察されたが、この現象が自励振動 (SPOC) であるかどうか、さらに検討が必要ではあるが、臨床的にも使用され、心静止を得ている薬剤により引き起こされた現象であり、自励振動に類似している動きであるため、今後も検討を行っていきたいと考えている。

<引用文献>

- ① Tallini YN, et al. Imaging cellular signals in the heart *in vivo*: Cardiac expression of the high-signal Ca^{2+} indicator GCaMP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006 ;103(12):4753-8.
- ② Terui T, et al. Troponin and titin coordinately regulate length - dependent activation in skinned porcine ventricular muscle. *J. Gen. Physiol.* 2008;131(3):275-83.
- ③ Sasaki D, et al. Auto-oscillations of skinned myocardium correlating with heartbeat. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2005;26(2-3):93-101
- ④ Serizawa T, et al. Real-time measurement of the length of a single sarcomere in rat ventricular myocytes: a novel analysis with quantum dots. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2011 ; 301(5):C1116-27.
- ⑤ Bub G, et al . Measurement and analysis of sarcomere length in rat cardiomyocytes *in situ* and *in vitro*. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2010;298(5):H1616-25.

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Serizawa T, Terui T, Kagemoto T, Mizuno A, Shimozawa T, Kobirumaki F, Ishiwata S, Kurihara S, Fukuda N. Real-time measurement of the length of a single sarcomere in rat ventricular myocytes: a novel analysis with quantum dots. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2011 ; 301(5):C1116-27.
- ② Inoue T, Kobirumaki-Shimozawa F, Kagemoto T, Fujii T, Terui T, Kusakari Y, Hongo K, Morimoto S, Ohtsuki I, Hashimoto K, Fukuda N. Depressed Frank-Starling mechanism in the left ventricular muscle of the knock-in mouse model of dilated cardiomyopathy with troponin T deletion mutation $\Delta K210$. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2013 ;63:69-78.
- ③ Kobirumaki-Shimozawa F, Inoue T, Shintani SA, Oyama K, Terui T, Minamisawa S, Ishiwata S, Fukuda N. Cardiac thin filament regulation and the Frank-Starling mechanism. *J. Physiol. Sci.* 2014;64(4):221-32.

[学会発表] (計 1 件)

- ① Single sarcomere imaging in the living heart. 日本生理学会総会、2012 年、3 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

照井 貴子 (TERUI, Takako)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号：10366247