

平成30年6月28日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04677

研究課題名(和文) In vivoナノ計測による心筋収縮制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of cardiac regulatory mechanisms by in vivo nano-imaging

研究代表者

福田 紀男 (Fukuda, Norio)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30301534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 23,210,000円

研究成果の概要(和文)：1) ラット幼若心筋細胞のZ線に γ -actinin-YC-Nano140を発現させ、細胞内局所のCa濃度とサルコメア長の同時計測を行った。2) マウス摘出心臓において、心筋細胞内局所のCa動態を計測する技術を開発した。3) マウスin vivo心臓から心筋細胞内のサルコメアの動きを高空間(20 nm)・時間(10 ms)分解能で捉えることのできるシステムを開発し、サルコメア動態とマクロパラメータ(心電図および左心室内圧)のリアルタイム同時計測を行った。4) ヒト心筋の単一筋原線維においてサルコメア自励振動を惹起させ、拡張型心筋症患者の筋原線維ではサルコメアの動態挙動が抑制されていることを見出した。

研究成果の概要(英文)：1) We performed simultaneous nano-imaging of intracellular Ca dynamics and single sarcomere length in rat neonatal cardiomyocytes, via expression of γ -actinin-YC-Nano140 in the Z disks. 2) We developed a high-precision method for the evaluation of the intracellular Ca dynamics in the isolated perfused mouse heart. 3) We developed a high speed (100 fps), high resolution (20 nm) nano-imaging system for myocardial sarcomeres in living mice. Using this system, we conducted three-dimensional analysis of sarcomere dynamics in left ventricular myocytes during the cardiac cycle, simultaneously with electrocardiogram and left ventricular pressure measurements. 4) We analyzed the mechanical properties of single sarcomere dynamics during sarcomeric auto-oscillations (Ca-SPOC) in myofibrils from donor hearts and from patients with severe dilated cardiomyopathy (DCM). Sarcomere dynamics was found to be depressed in DCM myofibrils, due to impairment of thick-thin filament sliding.

研究分野：生理学

キーワード：生物物理 ナノバイオ 分子イメージング 心筋 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

心臓は周期的に激しく動くため、*in vivo* ではリアルタイムでの細胞内分子情報の抽出が他の臓器に比べて格段に難しく、ほとんどの分子研究が個体環境とかけ離れた条件の下で行われている。しかしながら、生体（個体）では、個々の心筋細胞が3次的に配置し、かつ、ホルモンや自律神経系の調節を受けているため、ゲノムやタンパク質構造、培養・単離細胞における分子の挙動や細胞内のシグナル伝達機構を調べるだけでは、心臓生理学の最終目標である「*in vivo* 心臓の機能を分子レベルで、かつ系統的に解明する」ことは困難である。そこで本研究では、我々が独自に開発した心筋ナノイメージング技術を発展させ、マウス *in vivo* 心臓から心筋細胞におけるカルシウムイオン (Ca^{2+}) やアクチン分子の情報を高精度リアルタイムに抽出し、細胞単位での興奮収縮連関と心臓のマクロ機能との関係を分子レベルで、かつ系統的に明らかにする。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ナノ計測技術を駆使することによって、小動物の心筋細胞や *in vivo* 心臓から心筋細胞内分子情報を高精度で抽出する。すなわち、心筋細胞一つの μm 領域での Ca^{2+} イオンやアクチン分子の情報を高精度でリアルタイムに抽出、細胞単位での興奮収縮連関と心臓のマクロ機能との関係を分子レベルで、かつ系統的に明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、光学顕微鏡を基盤とした最先端のナノイメージング技術を、小動物の心筋細胞や *in vivo* 心臓に応用し、蛍光像を解析することによって心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度やサルコメア長を測定した。また、ヒト心筋より筋原線維を抽出する新たな方法を開発し、正常ならびに拡張型心筋症におけるサルコメアの動的挙動を解析した。以下に詳細をまとめる。

I) 心筋細胞を用いた実験：

我々は、ラットの培養幼若心筋細胞の Z 線 (α アクチニン) に AcGFP を発現させ、サルコメアの運動を高精度で計測することのできる実験系を構築することに成功している (*J Gen Physiol* 2014)。本研究では、この実験系を改良し、 Ca^{2+} 濃度にともなって蛍光シグナルを変化させる FRET 型 Ca^{2+} センサー [Yellow cameleon-Nano140 (YC-Nano140)] をラットの幼若心筋細胞の Z 線に発現させた。

そして、拍動中や電気刺激時の細胞内局所 Ca^{2+} 濃度と SL との同時計測を行った。

II) 摘出心臓を用いた実験：

マウスから摘出した心臓を大動脈から逆行性に灌流した。 Ca^{2+} 感受性蛍光色素である Cal520 を灌流液に加え、心臓表面からの共焦点観察によって、心筋細胞内 Ca^{2+} ダイナミクスを解析した。なお、この実験ではアクチンを阻害する BDM を使用し、心臓の動きを抑制した。レンズは、20 倍 (N/A, 1.0) の水浸レンズを用いた。撮影は 36 fps の速度で行った。

III) *In vivo* 心筋サルコメアイメージング：

α -Actinin-AcGFP のアデノウイルスベクター (ADV) を作製し、*in vivo* 心筋細胞の Z 線に AcGFP を発現させた。アデノウイルスベクター注入 2 日後には、心臓に AcGFP の発現が認められた。イソフルランにてマウスを麻酔した後、人口呼吸下、電気メスにて胸郭を取り去った。488 nm のレーザーを照射することによって蛍光観察を行い、サルコメア長のナノ計測を行った。レンズは、40 倍 (N/A, 0.8) と 60 倍 (N/A, 1.0) の二種類の水浸レンズを用いた。撮影は 100 fps の速度で行った。

IV) ヒトの心筋筋原線維を用いた実験：

我々は、収縮条件と弛緩条件の中間活性化条件において、横紋筋の筋原線維が自発的に振動することを発見している (SPOC)。心筋では、SPOC は生理的なイオン条件 ($\text{pCa} \sim 6.0$) において発生する (*Pflugers Arch*, 1996, 1999)。また我々は、各種動物から調製した心筋線維の SPOC 周期は、動物固有の静止心拍数と強く相関することを報告した (*Biochem Biophys Res Commun*, 2006)。本研究では、ヒトの心室筋標本における SPOC 中のサルコメア動態の解析を試みた。

4. 研究成果

心筋細胞、摘出心臓および *in vivo* 心臓の各階層において研究を行なった。以下、詳細をまとめる。

I) ラット幼若心筋細胞におけるサルコメア長と局所 Ca^{2+} 濃度の同時計測：

図 1 に示すとおり、我々は Cameleon-Nano140 をラット幼若心筋細胞の Z 線に発現させることに成功した。弛緩から収縮に至る際、すなわち、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加にともなって Yellow の蛍光強度が上がり、

Cyan の蛍光強度が下がることが確認された。これらの蛍光強度の比 (F_{yellow}/F_{cyan}) を細胞内 Ca^{2+} 濃度の指標とし、サルコメア長との関係を探ると、 F_{yellow}/F_{cyan} の上昇 (低下) にともなってサルコメア長が短縮 (伸長) することが確認された。また我々は、単一の筋原線維に沿って Ca^{2+} 濃度はほぼ均一に変化するが、サルコメアの応答性にはバラツキが存在することを見出した。さらに、 β 受容体刺激薬を投与すると、局所 Ca^{2+} 濃度ならびにサルコメアの変化率がいずれも上昇した。この論文は、生理学分野において世界で最も権威がある *Journal of General Physiology* 誌の表紙を飾った。

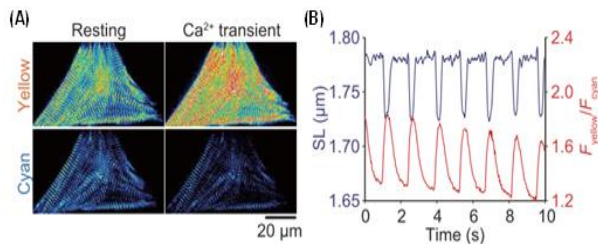


図 1: (A) Z 線に YC-Nano140 を発現させた幼若心筋細胞。細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加にともなって Yellow の蛍光強度が上がり、Cyan の蛍光強度が下がる。(B) 心筋細胞内局所の Ca^{2+} 濃度 (FRET によって計測: Yellow と Cyan の蛍光強度比を使用) (赤) と単一サルコメア長 (SL) (青) の同時計測。

II) 摘出心臓における心筋細胞内局所 Ca^{2+} 濃度の計測:

我々は、収縮関連分子の動態と心臓拍動の繋がりを調査するにあたり、マウスの摘出心臓内部の心筋細胞局所の Ca^{2+} 動態を計測する技術を開発した (図 2)。すなわち、心筋細胞内部では、 Ca^{2+} 濃度上昇は、ある決まった部位において円状に発生し、それが細胞内に広がってゆく。我々は「円解析法」を創出し、 Ca^{2+} 拡散の速度とその上昇が生じる原点位置と発生時間を特定することに成功した。その結果、 Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 遊離機構を介する Ca^{2+} の広がり速度は、 $120 \mu\text{m/s}$ であった。また、この直線式を外挿することによって、発火が生じた時間を計算することが可能となった。この場合、その時間は -51 ms であった (図 2C、矢印)。

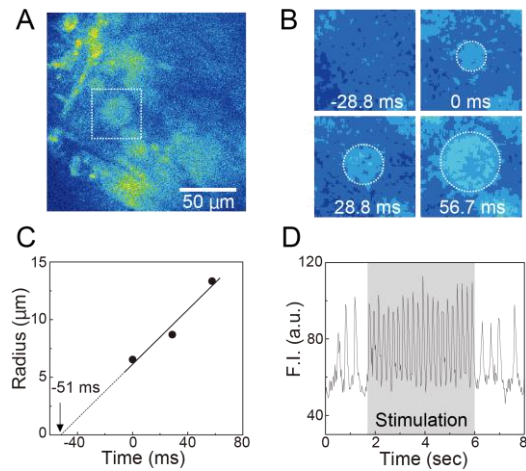


図 2: (A) マウス心臓内の Ca^{2+} 変化。点線の内部において Ca^{2+} 発火が始まっている。(B) (A) の点線内部で生じた Ca^{2+} 発火の広がり。1 フレーム毎に円でフィットした。(C) (B) において点線で示した円の半径と時間との関係 ($Y=0.12X+6.13$)。この直線式を外挿することによって、発火が生じた時間を計算することができる。この場合、 -51 ms (矢印)。(D) 自発発火時と電気パルス刺激時 (灰色帯) の Ca^{2+} 指示薬の蛍光強度。電気刺激により同期した Ca^{2+} トランジェントが生じていることがわかる。

III) In vivo マウスにおけるサルコメア長計測:

我々は、ナノ計測技術をマウス個体 (*in vivo*) に応用し、マウス *in vivo* 心臓の中から心筋細胞内のサルコメアの動きを高空間 (20 nm)・時間 (10 ms) 分解能で捉えることのできるシステムを独自開発、サルコメア動態と *in vivo* マクロパラメータ (心電図および左心室内圧) のリアルタイム同時計測を世界で初めて可能にした (図 3)。

まず、摘出心臓におけるサルコメア長を計測した。その結果、サルコメア長は静止時において $1.97 \pm 0.20 \mu\text{m}$ であり、イギリスの Bubらがラットにおいて報告している値とほぼ等しかった。次に、拍動時の約 30 周期分のサルコメア長変化を 13 匹のマウスについて解析し、拡張期および収縮期のサルコメア長を求めたところ、それぞれ 1.90 ± 0.06 、 $1.68 \pm 0.06 \mu\text{m}$ であった。すなわち、*in vivo* において、サルコメア長は静止時で得られた分布領域の比較的短いレンジで変動していることが明らかとなった。

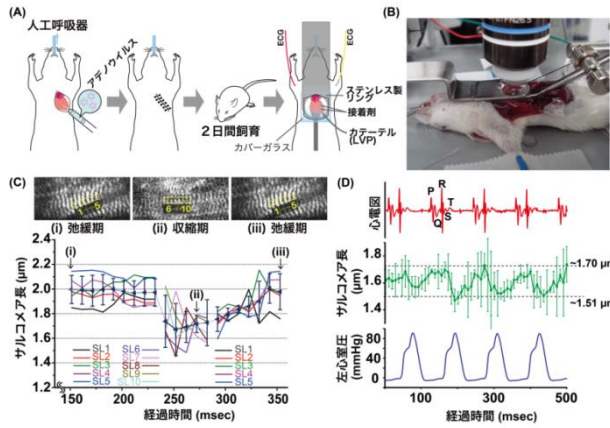


図 3: (A) マウスへのアデノウイルスベクター (ADV) 投与方法。濃縮した ADV を麻酔下に開胸したマウスの左心室表面に投与。2 日後に GFP の発現が安定して見られた。(B) *In vivo* 顕微システムによる、サルコメア長とマクロパラメーター (心電図、心臓内圧) の同時計測の様子。(C) 一回の心拍サイクルにおける同一心筋細胞内のサルコメア長変化。同一細胞内でもサルコメア長には ~ 300 nm のバラツキがある。上は、計測した心筋細胞の領域を示す (黄色枠内)。心筋に特有な横紋構造が明瞭に見られる。(D) ナノ情報とマクロ情報の融合。動画取得開始から 0.5 秒までの平均サルコメア長 (中段) および、心電図 (上段) と左心室内圧 (下段)。

図 3C に示すとおり、収縮期、拡張期のいずれにおいても、最大で約 300 nm もサルコメア長が異なっていた。すなわち、生理的条件下、サルコメア長には不均一性が存在することが明らかとなった。

ところで、心臓ポンプ機能の重要な特性として、心室容積が拡大するほど一回拍出量が増大する「Frank-Starling の法則」がよく知られている。この法則の基盤は、単離した心筋線維において、サルコメア長を伸展するほど収縮時の発生力が大きくなる「長さ-張力関係」に基づいている。我々は、本研究において、*in vivo* での拡張末期のサルコメア長 (dia. SL) と拡張末期と収縮末期の左心室内圧の差 (ΔLVP) の関係を解析した (図 4)。意外なことに、dia. SL と ΔLVP には相関関係は存在せず、実際のサルコメア長の変化分 (ΔSL) と ΔLVP との間に有意な相関関係が認められた。一般に、生理的な中間活性化状態では、クロスブリッジ形成によってアクチン-ミオシンの結合が促進し、発生張力を増強させることが知られている。今回の我々の結果は、*in vivo* において、クロスブリッジ形成に依存したサルコメアの協同的活性化の特性が心臓機能の制御に大きく貢献していることを示唆している。

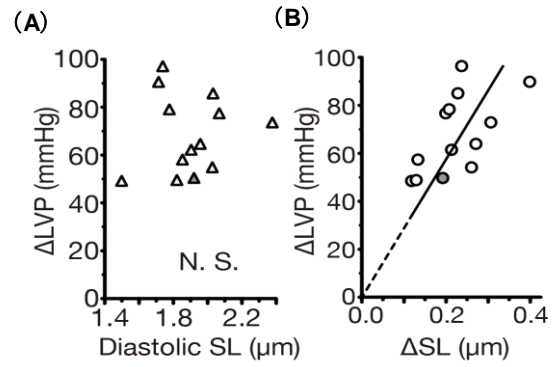


図 4: (A) 拡張末期サルコメア長 (Diastolic SL) と拡張および収縮末期の左心室内圧の差 (ΔLVP) の関係。(B) 拡張および収縮末期のサルコメア長の差 (ΔSL) と ΔLVP の関係。

また、我々は、画像再構築法を独自に開発した。すなわち、実験後、画像を再構築し、心臓サイクルのすべての時点において焦点の合う動画を作成した。その結果、サルコメア長の変化と LVP とは逆相関の関係にあることが明らかとなった (図 5)。

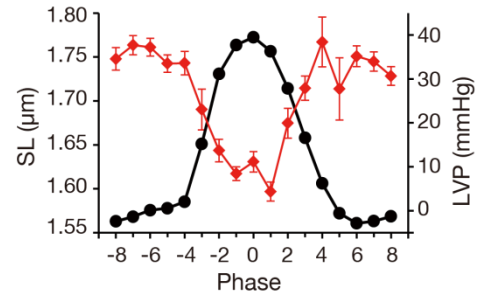


図 5: 拍動 1 周期のサルコメア長 (SL) と左心室内圧 (LVP) の変化。LVP のフェーズを 17 に分割し、各フェーズにおいて焦点の合っている画像を選んで組み合わせた。

IV) ヒト心筋筋原線維における自励振動 (SPOC) 解析:

我々は、まず、ヒト心筋から心筋細胞の全長 (~ 100 μm) に近い単一筋原線維の抽出法を確立することに成功した (図 6)。通常、筋標本から筋原線維を得る際、硬直条件においてホモジナイズが行われているが、今回、弛緩条件においてホモジナイズを行うことによって、正常・病態のいずれの標本からも再現性良く長い筋原線維を抽出することが可能になった。本研究では、特に心筋トロポニン I (cTnI) に変異 (K36Q) を有する拡張型心筋症 (DCM) の標本に着目した。cTnI-K36Q 標本では、収縮・伸展速度が遅いという DCM 心筋に特有の現象が見られ、その結果、SPOC の周期が長くなった。ところが、我々が開発したトロポニン入れ替え法 (*J Gen Physiol*, 2009) を用いてトロポニン I を正常なものに入れ替えると、SPOC 波形が正常化した。

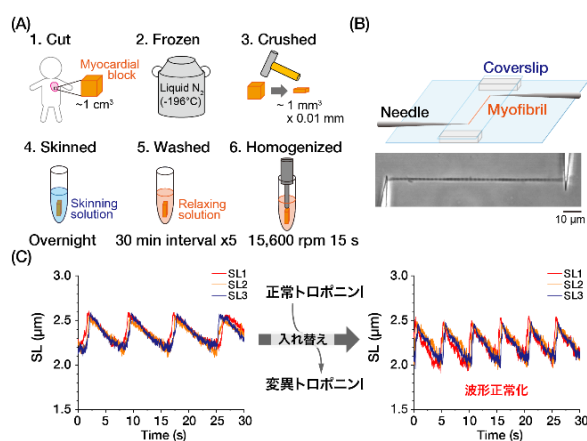


図 6: (A) ヒト心筋筋原線維の調製法。死後、直ちに (30 分以内)、心臓の様々な部位から心筋を摘出し (1)、液体窒素で凍結保存 (2)。凍結標本を小型のハンマーで打ち砕き、除膜処理 (3, 4)。その後、弛緩溶液にて洗浄し、ホモジナイズ (5, 6)。(B) 得られた心筋筋原線維を二本のガラス微小針に取り付けたところ。全長は心筋細胞の長軸方向の長さ (~100 μm) に匹敵。(C) 左: トロポニン I に変異を有する DCM 患者の心筋筋原線維の SPOC 波形。収縮、伸展速度が遅いという、DCM 心筋特有の現象が見られる。トロポニン I を正常なものに入れ替えると、SPOC 波形が正常化され、かつ、その周期が短くなった。

これらの結果は、SPOC 現象の分子理解を通して、心臓拍動の分子基盤を明らかにできる可能性を強く示唆する。現在、新たな診断基準として臨床現場に提供することを目指し、健常および病態ヒト心筋標本の SPOC 特性を評価、心筋症のタイプや重症度の規格化を進めている。心筋症の診断は、エコーや心電図などのマクロ情報、すなわち古典的バイオメカニクス情報に基づいて行われているのが実情であり、診断基準も曖昧である。本研究開発課題で創出する方法が一般化されれば、心臓カテーテルによって患者からごく一部の心筋標本を採取し、SPOC 特性を解析することによって病態の分類や重症度の判定を厳密に行い、最適治療法を速やかに判断することが可能になる。この診断法は心疾患による死亡率を大幅に低下させることが期待される。

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 7 件)

1) F. Kobirumaki-Shimozawa, T. Shimozawa, K. Oyama, Y. Kushida, T. Terui, S. Ishiwata, N. Fukuda. Optimization of fluorescent labeling for *in vivo* nano-imaging of sarcomeres in the mouse heart. *BioMed Research International* 2018 (in press).

2) T. Kagemoto, K. Oyama, M. Yamane, S. Tsukamoto, F. Kobirumaki-Shimozawa, A. Li, C.

dos Remedios, N. Fukuda, S. Ishiwata. Sarcomeric auto-oscillations in single myofibrils from the heart of patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation: Heart Failure* 2018 (in press).

3) S. Ishiwata, M. Miyazaki, K. Sato, K. Nakagome, S.A. Shintani, E. Kobirumaki-Shimozawa, N. Fukuda, K. Suzuki, J. Takagi, Y. Shimamoto, T. Itabashi. Dynamic properties of bio-motile systems with a liquid-crystalline structure. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* 2017;647:127-150.

4) T. Shimozawa, E. Hirokawa, E. Kobirumaki-Shimozawa, K. Oyama, S.A. Shintani, T. Terui, Y. Kushida, S. Tsukamoto, T. Fujii, S. Ishiwata, N. Fukuda. *In vivo* cardiac nano-imaging: A new technology for high-precision analyses of sarcomere dynamics in the heart. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2017;127:31-40.

5) S. Tsukamoto, T. Fujii, K. Oyama, S.A. Shintani, T. Shimozawa, E. Kobirumaki-Shimozawa, S. Ishiwata, N. Fukuda. Simultaneous imaging of local calcium and single sarcomere length in rat neonatal cardiomyocytes using yellow Cameleon-Nano140. *Journal of General Physiology* 2016;148:341-355.

6) F. Kobirumaki-Shimozawa, K. Oyama, T. Shimozawa, A. Mizuno, T. Ohki, T. Terui, S. Minamisawa, S. Ishiwata, N. Fukuda. Nano-imaging of the beating mouse heart *in vivo*: Importance of sarcomere dynamics, as opposed to sarcomere length *per se*, in the regulation of cardiac function. *Journal of General Physiology* 2016;147:53-62.

7) S.A. Shintani, K. Oyama, N. Fukuda, S. Ishiwata. High-frequency sarcomeric auto-oscillations induced by heating in living neonatal cardiomyocytes of the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015;457:165-170.

[学会発表] (計 14 件)

1) 小比類巻 生, 大山廣太郎, 下澤東吾, 石渡信一, 福田紀男. マウス心筋における単一サルコメア動態の *in vivo* ナノ解析. 日本生理学会、サンポートホール高松、2018 年 3 月。

2) 大山廣太郎, Zeeb Vadim, 新井智実, 伊藤秀城, 新谷正嶺, 鈴木 団, 福田紀男, 石渡信一. 光熱変換顕微鏡を用いた温度センシングの一細胞解析. 日本生理学会、サンポート

ホール高松、2018年3月。

3) 大山廣太郎、山澤徳志子、村山尚、原田慶恵、飯野正光、福田紀男、石渡信一、鈴木 団。悪性高熱症の原因となる骨格筋リアノジン受容体1変異体の熱刺激応答。生体運動研究合同班会議、法政大学、2018年1月。

4) 大山廣太郎、新谷正嶺、塚本精一、小比類巻 生、下澤東吾、鈴木 団、石渡信一、福田紀男。サルコメア収縮の蛍光イメージングと光操作技術の開発。精神・神経疾患研究開発費「ジストロフィン欠損モデル動物を基盤とした筋ジストロフィーの新しい治療法開発」平成29年度研究班会議、国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター教育研修棟 ユニバーサルホール場所、2017年12月。

5) 塚本精一、藤井輝之、大山廣太郎、下澤東吾、小比類巻 生、石渡信一、福田紀男。Yellow Cameleon-Nano140 融合 α -actinin を用いた幼若心筋細胞におけるサルコメア動態と局所 Ca^{2+} 濃度の同時観測。生理学研究所研究会「シグナル動態の可視化と操作に基づく多階層機能解析の新展開」、生理学研究所、2017年9月。

6) 下澤東吾、広川恵里沙、小比類巻 生、大山廣太郎、照井貴子、石渡信一、福田紀男。In vivo 心筋ナノイメージング。生理学研究所研究会「シグナル動態の可視化と操作に基づく多階層機能解析の新展開」、生理学研究所、2017年9月。

7) 塚本精一、大山廣太郎、藤井輝之、小比類巻 生、石渡信一、福田紀男。ラット幼若心筋細胞のZ線における Yellow Cameleon-Nano140 融合 α -actinin 発現を用いたサルコメア動態と局所的カルシウムの同時観測。日本生理学会、アクトシティ浜松、2017年3月。

8) 小比類巻 生、福田紀男。In vivo cardiac nano-imaging: high-resolution analysis of excitation-contraction coupling in the heart。日本生理学会、アクトシティ浜松、2017年3月。

9) 小比類巻 生、大山廣太郎、下澤東吾、新谷正嶺、広川恵里沙、照井貴子、石渡信一、福田紀男。ナノイメージングによるマウス心臓の in vivo サルコメア動態解析。日本生物物理学会。金沢大学、2015年9月。

10) F. Kobirumaki-Shimozawa、K. Oyama、T. Shimozawa、T. Terui、S. Ishiwata、N. Fukuda。High-speed, high-performance real-time imaging of physiological sarcomere dynamics in the beating heart in vivo。米国生物物理学会、Los Angeles、2016年2月。

11) S. Tsukamoto、K. Oyama、T. Fujii、E. Kobirumaki-Shimozawa、T. Shimozawa、S.A. Shintani、S. Ishiwata、N. Fukuda。米国生物物理学会、Los Angeles、2016年2月。

12) 大山廣太郎、小比類巻 生、下澤東吾、福田紀男。In vivo ナノイメージングによる心筋収縮の可視化と熱による制御。第93回日本生理学会年会、北海道大学、2016年3月。

13) 塚本精一、大山廣太郎、藤井輝之、小比類巻 生、石渡信一、福田紀男。Yellow Cameleon-Nano140 を用いたラット幼若心筋細胞のサルコメア長と細胞内カルシウムの同時観測系の開発。第93回日本生理学会年会。北海道大学、2016年3月。

14) 榎田康晴、塚本精一、藤井輝之、大山廣太郎、小比類巻 生、福田紀男。マウス心臓上における移植ラット幼若心筋のサルコメア動態の定量的解析。第93回日本生理学会年会。北海道大学、2016年3月。

〔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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田紀男 (FUKUDA NORIO)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30301534

(2) 研究分担者

照井貴子 (TERUI TAKAKO)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：10366247

小比類巻 生 (FUYU)

KOBIRUMAKI-SHIMOZAWA)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：40548905

大山 廣太郎 (OYAMA KOTARO)

高崎量子応用研究所・先端機能材料研究部・

主任研究員

研究者番号：70632131

(3) 連携研究者

石渡信一 (SHIN'ICHI ISHIWATA)

早稲田大学・理工学術院・名誉教授

研究者番号：10130866