

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16325

研究課題名(和文) 動的力学負荷による心血管病形成：「力」の生体光解析

研究課題名(英文) In vivo imaging to reveal the mechanisms of cardiovascular diseases induced by mechanical stress

研究代表者

瀬尾 欣也 (Seo, Kinya)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：40747698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：血行力学的負荷に対して心臓がどのように応答するのか、独自に開発した生体イメージング手法により解析を行った。特に、力学的負荷により活性化される機械刺激感受性チャネルに着目し、イオンチャネル欠損マウスや生体心機能解析技術、単一心筋細胞の微小操作技術などの生理学的実験手法を組み合わせ解析を行った。その結果、チャネル欠損マウスの心臓では、急激な血行力学的負荷の上昇に対して通常見られる心機能調節機構の一部が欠如していた。心臓イメージング技術により、力学的負荷に対する心筋組織の変形・カルシウム応答の解析を現在進めている。機械刺激感受性チャネルをターゲットにした心不全治療薬など、治療開発に繋げて行く。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanisms of cardiovascular diseases induced by mechanical stress, we developed in vivo imaging technique to assess morphological changes and calcium dynamics simultaneously in the stressed heart. Combined with in vivo functional analysis and micro-manipulation technique of isolated cardiomyocyte, we revealed that a mechano-sensitive channel plays a crucial role in the contractility augmentation of the heart in response to acute mechanical load. Using in vivo imaging technique, we are currently evaluating the structural deformation and calcium dynamics in response to acute mechanical load to uncover the role of the mechano-sensitive channel.

研究分野：生体力学

キーワード：生体イメージング 心臓力学

1. 研究開始当初の背景

心不全は、血行力学負荷にさらされた組織のリモデリングを経て発症する。短いタイムスケールでは力学的過負荷によって引き起こされる細胞内へのカルシウム流入とそれに伴う機能変化・細胞内シグナルの変化、長いタイムスケールでは心筋細胞や血管平滑筋細胞の肥大、線維芽細胞の過形成や脱分化により組織リモデリングが引き起こされる。力学負荷は心不全や心血管イベントの重要な危険因子であるにもかかわらず、生体内心血管に加わる「力」をミクロレベルで評価する方法は存在しなかった。細胞・組織・臓器レベルの個々の実験手法では、細胞レベルで起きる分子応答と、マクロなレベルで起きる病態との繋がりを十分に理解することはできない。生体内の詳細な力分布と細胞動態を同時に知ることができれば、力学負荷と病態の関係の理解に繋がり、力学負荷軽減をターゲットにした新たな治療開発に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が独自に開発した細胞・臓器レベルの生理学的実験手法に加え、実際には見ることの出来ない「力」を光に置き換えて計測し、血行力学負荷に対する心筋組織および血管内皮の応力分布の可視・定量化するイメージング手法を組み合わせることで、細胞内シグナル変化が如何に心血管の病態、特に心不全や血栓症を引き起こすのかを明らかにする。本研究では特に、血行力学負荷に対する急性期でのストレス応答異常・機能低下がなぜ起きるのか、機械刺激感受性チャンネルに着目した。

3. 研究の方法

急性大動脈狭窄時の圧容積ループ測定

機械刺激感受性チャンネル欠損マウス・野生型マウスに大動脈狭窄術 (TAC, transverse aortic constriction) により心臓へ急性的な後負荷を加えた際の早期での心機能変化

を、カテーテルによる圧容積ループ測定法により評価した。マウスを3%イソフルランによる麻酔下において開胸し、26G針を大動脈弓部にセットする。微小圧容積カテーテル (Millar Instruments, TX) を左心室心尖部から挿入してチップの先端が大動脈基部に来るようにセットする。正常時の心機能データを測定後、大動脈弓を26G針の上から糸で縛ることで、左心室壁へ後負荷を加える。その後15分間に渡り圧容積ループを計測し、心機能変化を調べた。

細胞微小操作法 (カーボンファイバー法)

タンパク質分解酵素を用いて心臓から単離した心筋細胞に対して、カーボンファイバーを用いた微小操作技術により細胞一つに伸展刺激を与え、その収縮力変化を測定した。

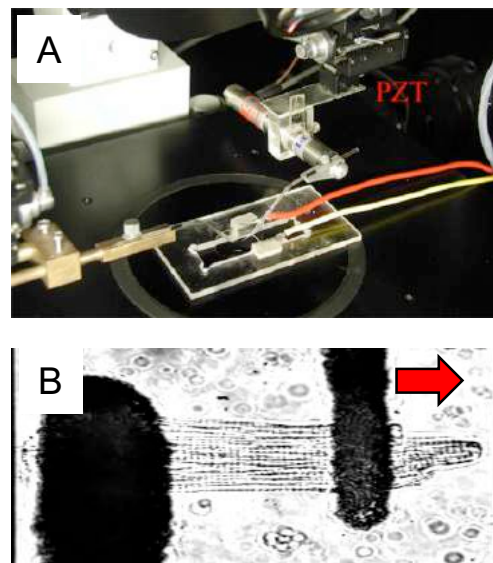


図 1 A. カーボンファイバー装置,
B. 単一心筋細胞伸展の様子

収縮力測定では図 1A のような装置の、2本のカーボンファイバーをマイクロマニピュレータで操作し、図 1B のように心筋細胞両端に付着させて実験を行った。2本のうち一方は心筋細胞の収縮・弛緩・伸展につれて変形するもので、直径 $7\mu\text{m}$ 、長さ $1\sim 1.2\text{mm}$ 、 $80\sim 150\text{nN}/\mu\text{m}$ の柔軟なものを用い、もう一方は収縮する細胞を固定するためのもので、

直径 30 μm 、長さが 1mm 以下、4,000nN/ μm 以上の硬いものを用いた。細いカーボンファイバーに piezo 素子を接続し、コンピュータ制御により、細胞に伸展刺激を与えた。細胞の伸展・収縮レベルと追跡する細いカーボンファイバーの動きを、FFT によるサルコメ縮の追跡、カーボンファイバー端を追跡することにより評価した。細胞の収縮力 (F) はカーボンファイバーの撓みから次の方程式により算出した。

$$F = K(\Delta LP - \Delta LF)$$

K : カーボンファイバーの剛性

ΔLF : カーボンファイバー間の距離

ΔLP : piezo の稼働距離

生体分子イメージング

拍動する心臓、脈動する血管、の生理学的条件・病態下で細胞連関やその異常を明らかにするために、高速高解像度の生体二光子イメージングと、心臓の動きによる測定箇所ずれを補正する計測制御技術及び信号処理技術を組み合わせる方法を活用した。画像取得には、多光子励起・レゾナントスキャンによる高速イメージングに加え、piezo 素子とサーボモータ制御による観察ステージ・対物レンズの位置補正技術を組み合わせて、心筋組織深部の XYZT 高速イメージングを行った。視野の中に追跡対象を定め、フィードバック・フォワード予測制御により動きを抑えた。さらに、ソフトウェアによる動きのキャンセルも行った。測定開始時の画像上で追跡対象点を定めて小ユニットに分割し、各時点の画像内で最も類似した箇所を相互相関法により求めるアルゴリズムを用いた。これにより、画像上の測定中心、追跡対象点を仮想的に静止させた連続画像を取得した。また「力」そのものを光信号として捉え、血圧や血流により心筋組織・血管内皮に加わる力学負荷を定量化した。血行力学負荷によって心筋組織の変形に伴う動き生体イメージングにより追

跡し、組織の歪み・応力を評価した。

4. 研究成果

血行力学負荷に対する心臓の応答と機械刺激感受性チャネル

生体レベルの評価として、大動脈狭窄術により心臓に後負荷を与え、それに対する心機能の時間変化を 3 週間に渡り、心臓超音波検査により評価した。

その結果、機械刺激感受性チャネル欠損マウスでは、術後 1 週間という早い時期で肥大及び収縮力の低下が見られた。しかし、術後 3 週間では対照群のマウスも収縮力が落ちて肥大が生じ、統計的有意差が見られなくなった。

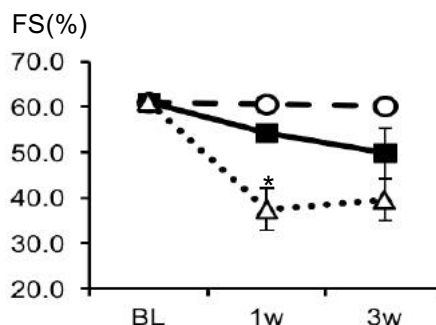


図 2. 機械刺激感受性チャネル欠損マウス (△) では、大動脈狭窄後 1 週間で、心機能の指標 (FS) が対照マウス (■) に比べて低下

血行力学負荷に対する早期の心機能応答

上の結果を受け、より早期の力学的負荷に対する心機能応答に絞って評価を行った。

微小カテーテルを心尖部から挿入して左室の圧容積ループをモニターしながら、大動脈狭窄を行い、その後の心機能変化を 15 分に渡り計測した。

まず、野生型対照群のマウスでは、大動脈狭窄直後にはフランク・スターリングの法則により拡張期末容積の増加に伴い収縮力が増加し、その後負荷を加えた状態でさらに時間が経過すると、Anrep 効果により左室収縮期圧を保った状態で拡張末期容積が低下す

るといふ、二次的な収縮能の増加を示した。一方で、機械刺激感受性チャネル欠損マウスでは、フランク・スターリングの法則は見られたが、Anrep 効果が見られなかった。測定した圧容積ループから心機能の指標を算出し、その時間変化を調べたところ、機械刺激感受性チャネル欠損マウスではそれらの指標が対照群に比べて低下していた。

伸展刺激に対する単一心筋細胞の応答

単離した心筋細胞に対してカーボンファイバーにより伸展刺激を加えた際の、発生張力の変化を測定した。

野生型対照群の心筋細胞では、伸展直後にフランク・スターリングの法則により収縮力の増加が見られ、その後 Anrep 効果により二次的な収縮力増加が見られた。一方で、機械刺激感受性チャネル欠損マウスの心筋細胞では、フランク・スターリングの法則は見られたものの、二次的な収縮力増加が観察されなかった。伸展活性化チャネルの阻害薬であるタランチュラ毒が二次的な収縮力増加を抑え、機械刺激感受性チャネル欠損モデルと似た応答を示すことも確認した。

血行力学的負荷時の心臓イメージング

機械刺激感受性チャネル欠損マウスにおいて、細胞レベルで見られた二次的な収縮力増加機構の欠如が、如何に臓器レベルでの機能不全につながるのか、二光子励起顕微鏡による生体分子イメージングによる解析を行った。

開発したイメージング手法では図 3A のように、白枠部分の動きを追跡し、座標変換により仮想的に静止させることにより、拍動に伴う構造変化を解析することを可能にした。また、カルシウム蛍光タンパクを発現させたマウスを用いて、拍動に伴うカルシウム応答を可視化することに成功した (図 3B)。

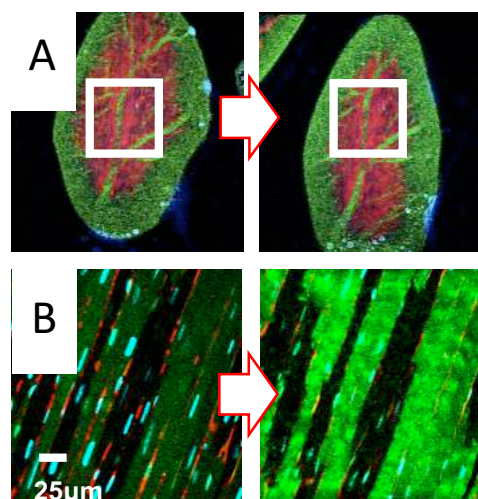


図 3. 生体分子イメージングによる拍動心の可視化. **A.** 拍動に伴う心筋構造の変形 (赤: 心筋、緑: 血液)、白枠部を追跡し仮想的に止めることで拍動に伴う画像のぶれを補正した. **B.** カルシウム可視化マウスを用いた拍動に伴うカルシウム応答の可視化 (青: 細胞核、緑: カルシウム、赤: 血管)

今後この手法を、大動脈縮窄による急性圧負荷マウスに適用し、機械刺激感受性チャネル欠損マウスと野生型対照マウスでどのように異なるか比較検討していく。

ずり応力変化に伴う血管内皮障害・血栓形成の可視・定量化

心臓イメージングによる機能不全の解析に並行して、血管内皮障害・血栓形成の解析を進めた。血管壁の運動 (血管内皮・血管平滑筋) と循環中の赤血球・白血球・血小板の動きをそれぞれ特異的に標識し、三次元高速高解像度で可視化・解析することを可能にした (図4A)。また、生体内の血流を局所的に二光子レーザーにより変化させ、血管内壁にずり応力を負荷する手法を開発した (図4B)。これにより、生体でずり応力の高い箇所、乱流箇所を局所的に作り、その付近における、血球の動きと血管内皮細胞の相互作用 (血管

内皮の損傷・白血球の吸着・血小板の凝集など)を可視化することができる。イメージングにより得られた血球・血管内皮の相互作用箇所を比較検討し、血管内皮障害の機序を明らかに、動脈硬化・血栓症の発症機序解明に繋げていく。

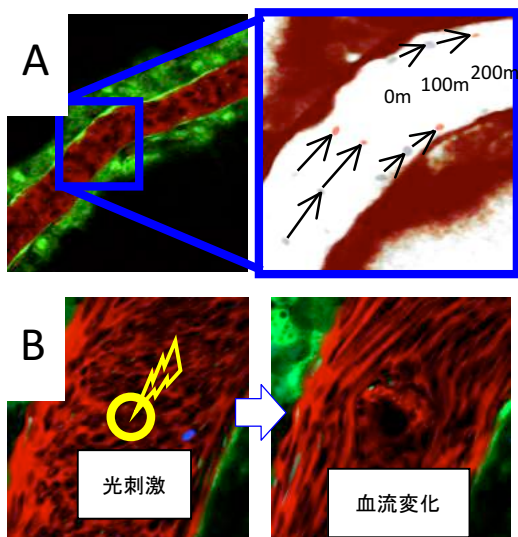


図 4 A. 生体分子イメージングによる血球の動きの可視解析(緑:血管碧、赤:血流)、青枠内:血小板の動き・速度の解析, B. 光刺激による血流の変化・ずり応力変化

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 6 件)

① Kinya Seo, Asuka Sakata, Satoshi Nishimura, Visualization of taste buds reveals sensory degradation in obese mice, 17th International Symposium on Olfaction and Taste, 2016/6/5-9, 神奈川

② 坂田飛鳥、瀬尾欣也、西村智、トロンビンは血管内皮破城部位での血小板活性化と白血球遊走に重要である、第 39 回日本血栓止血学会、2016/6/16-18、奈良

③ Nemekhbayar Baatartsogt, Asuka Sakata, Kinya Seo, Sou Nakamura, Koji Eto, Satoshi Nishimura, Crosstalk of Mitochondrial Release and Shear Stress in Platelet Activation, 第 38 回日本血栓止血学会、2016/6/16-18、奈良

④ Asuka Sakata, Kinya Seo, Satoshi Nishimura, Temporal blockade of thrombin activity enhance secondary fibrinolysis, 9th Congress of APSTH, 2016/10/06-9, Taipei

⑤ Asuka Sakata, Kinya Seo, Satoshi Nishimura, Temporal blockade of thrombin activity enhance secondary fibrinolysis, The 1st Joint Meeting of ISFP and PA

Workshop, 2016/10/017-21, Shizuoka

⑥ Nemekhbayar Baatartsogt, Asuka Sakata, Kinya Seo, Koji Eto, Satoshi Nishimura, Random mechanical stress enhanced mitochondrial fission and functional thrombopoiesis in mice bone marrow megakaryocytes, The 39th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2016/11/30-12/2, 神奈川

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬尾 欣也 (SEO, Kinya)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号: 40747698