

令和元年6月6日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10627

研究課題名(和文) in vivoイメージング技術を用いた心筋組織の可視化による病態生理の解明

研究課題名(英文) Intravital imaging of cardiac tissue reveals pathological dynamics in injured heart

研究代表者

松浦 良平 (Ryohei, Matsuura)

大阪大学・医学系研究科・助教(常勤)

研究者番号：10768922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年多光子励起顕微鏡の登場により、“intravital imaging” とよばれる、生かしたままに観察したい臓器を観察できるようになった。しかし心臓は激しく動く臓器であり、実際に生きたままの状態では心筋細胞等を観察する手段は十分に確立していなかった。本研究において、心臓を固定する二光子顕微鏡用のスタビライザーを開発し、虚血再灌流モデル動物の心筋組織を“生きたまま”で観察することができた。また独自に動画全体のブレや歪みを補正するプログラムを作成し、細胞レベルでの心筋の動きを定量化した。今後本研究のイメージング技術により、虚血性心疾患を始めとした心疾患モデルに対する創薬への応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓は激しく動く臓器であり、実際に生きたままの状態では心筋細胞等を観察する手段は十分に確立しておらず、リアルタイムかつ細胞レベルで心筋組織がどのような挙動をとるか明らかではなかった。本研究において、心臓を固定する二光子顕微鏡用のスタビライザーを開発し、虚血再灌流モデル動物の心筋組織を“生きたまま”で観察することができ、細胞レベルでの心筋の動きを定量化したことにより、本イメージング技術が循環器作動薬や新薬の心毒性の効果判定などの創薬スクリーニングへの応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Recent advances in intravital microscopy have provided insight into dynamic biological events at the cellular level. However, real-time in vivo cellular imaging of the beating heart has not been fully established, mainly due to cardiac and respiratory motion. Here we report the successful recording of clear in vivo moving images of the beating rat heart by two-photon microscopy facilitated by a novel cardiac stabilizer. Subcellular dynamics of the major cardiac components in cardiac myocytes were visualized. We also observed ischemia/reperfusion injury in cardiac tissue. We quantified the cell motions in these models with a new image-processing program. This imaging system can serve as an alternative modality for real time monitoring in animal models and cardiological drug screening, and can contribute to the development of more effective treatments for cardiac diseases.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：in vivo イメージング 心筋虚血 虚血再灌流障害 不均一性

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

1. 研究開始当初の背景

近年低侵襲で深部組織の観察に適した“多光子励起顕微鏡”の登場により、“intravital imaging”とよばれる、実験動物を麻酔下で生かしたままで観察したい臓器を露出して観察できるようになった。二光子顕微鏡で生体組織の深部を観察するには十分固定しなければならないが、心臓は“動く臓器”であり、実際に生きたままの状態で心筋細胞や炎症細胞等がどのような挙動をとるか観察する手段は十分に確立していなかった。

2. 研究の目的

本研究は冠動脈バイパス術に用いられるスタビライザーに着想し心臓を固定する二光子顕微鏡用のスタビライザーを開発し、疾患モデル動物の心筋組織を“生きたまま”で観察し、虚血再灌流障害における細胞の挙動を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

アクリル樹脂の中央にすり鉢状の孔を作成しカバーガラスを載せ、側孔から吸引することで心臓をカバーガラスに吸着させるスタビライザーを作成した。二光子顕微鏡にて GFP-transgenic Lewis rat を全身麻酔下にて挿管し、蛍光プローブ (Dextran や Isolectin B4) を投与して蛍光染色し生きたままの状態 で正常心筋を観察した。

4. 研究成果

生きた状態で GFP signal から心筋細胞の筋原線維や細胞核を認め、TMRE 投与にてミトコンドリアを認めた。また Dextran や Isolectin B4 投与にて微小血管や微小血管内を流れる血球成分、血管内皮を認めた。また独自に Free Formed Deformation (FFD) プログラムを作成し、動画全体のブレや歪みを補正した。そのプログラムにより Heat-map を作成することで、細胞レベルでの心筋の動きを視覚化した。

ついで、GFP-transgenic Lewis rat の LAD を結紮し血流を遮断し、心筋細胞や白血球の細胞動態の観察・検討を行った。LAD を結紮し 5 分間虚血にしたところ、その 10 分後には心筋細胞の GFP シグナルは patch 状に低下した。TMRE 染色で同様に観察したところ、GFP シグナルが低下した細胞は TMRE が染まらない細胞と一致した。FFD を用いて動画を解析すると、細胞の弛緩収縮に逆相関が見られたため、GFP シグナルが低下した細胞は細胞死を来し弛緩能を失ったと考えられた。

また PCI balloon を用いて虚血・再灌流モデルを確立し real time で観察したところ、虚血直後から心筋の収縮能が低下した。15 分後には Dextran が心筋細胞内に浸出し細胞透過性が亢進していた (Permeability index 0.4 0.6)。1 時間虚血～1 時間再灌流後に観察したところ細胞透過性はさらに亢進し (Permeability index 0.4 1.2)、虚血領域の微小血管に経時的に白血球が接着した。微小血管に血流を認めなかったため、no-reflow 現象の原因と考えられた。

今後、本研究の in vivo imaging 技術により、虚血性心疾患を始めとした心疾患モデルに対する新しい創薬スクリーニングシステム等への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Matsuura R, Miyagawa S, **Fukushima S**, Goto T, Harada A, Shimozaki Y, Yamaki K, Sanami S, Kikuta J, Ishii M, Sawa Y. Intravital imaging with two-photon microscopy reveals cellular dynamics in the ischemia-reperfused rat heart. *Sci Rep.* 8(1): 15991, Oct 30, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-34295-w (査読あり)

[学会発表](計 4 件)

Ryohei Matsuura, Shigeru Miyagawa, **Satsuki Fukushima**, Akima Harada, Yuri Shimozaki, Kazumasa Yamaki, Sho Sanami, Junichi Kikuta, Masaru Ishii, Yoshiki Sawa. The development of a new real-time in vivo imaging system with two photon microscopy for analyse subcellular dynamics of injured rat heart. American Heart Association Scientific Sessions 2017. Anaheim, USA, November 2017.

Ryohei Matsuura, Shigeru Miyagawa, Akima Harada, Junichi Kikuta, Yuri Shimozaki, Kazuhisa Yamaki, Masaru Ishii, Yoshiki Sawa. Real-Time Cellular Imaging of the Beating Heart in Rat by Using Two-Photon Microscopy with an Original Stabilizer. ESC Congress 2017. Barcelona, Spain. August 2017.

松浦良平、宮川繁、原田明希摩、八巻和正、下寄ゆり、菊田順一、石井優、澤芳樹「二光子励起顕微鏡を用いたラット心筋組織に対する real-time in-vivo イメージング法の開発」第16回日本再生医療学会総会 仙台 2017年3月

Ryohei Matsuura, Shigeru Miyagawa, **Satsuki Fukushima**, Akima Harada, Shin Yajima, Junichi Kikuta, Koichi Toda, Masaru Ishii, Yoshiki Sawa, Impact of Real-Time Cellular Imaging in the Mechanism of Ischemia-Reperfusion Injury in Rat by Using Two-Photon Microscopy. American Heart Association Scientific Sessions 2016. New Orleans, USA November 2016.

〔図書〕(計 1件)

Matsuura R, Miyagawa S, Kikuta J, Ishii M, Sawa Y. Intravital Imaging of the Heart at the Cellular Level Using Two-Photon Microscopy. *Methods Mol Biol.* 1763:145-151, 2018. doi: 10.1007/978-1-4939-7762-8_14. (査読なし)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2件)

名称：顕微鏡用スタビライザー
発明者：澤芳樹 宮川繁 福嶋五月 松浦良平
権利者：国立大学法人大阪大学、大日本印刷株式会社
種類：特許
番号：特開 2018-77386(P2018-77386A)
出願年：平成 28 年 11 月 10 日(2016.11.10)
国内外の別： 国内

名称：生体組織画像解析システム、画像処理システム及びプログラム
発明者：下寄 ゆり、八巻 和正 長井 太郎 澤芳樹 宮川繁 松浦良平
権利者：国立大学法人大阪大学、大日本印刷株式会社
種類：特許
番号：特開 2018-77155(P2018-77155A)
出願年：平成 28 年 11 月 10 日(2016.11.10)
国内外の別： 国内

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：秦 広樹
ローマ字氏名：Hata Hiroki
所属研究機関名：大阪大学
部局名：医学系研究科
職名：特任准教授(常勤)
研究者番号(8桁): 80638198

研究分担者氏名：増田 茂夫
ローマ字氏名：Masuda Shigeo

所属研究機関名：大阪大学
部局名：医学系研究科
職名：特任准教授（常勤）
研究者番号（8桁）：10396749

研究分担者氏名：斎藤 俊輔
ローマ字氏名：Saito Shunsuke
所属研究機関名：大阪大学
部局名：医学系研究科
職名：助教
研究者番号（8桁）：30600126

研究分担者氏名：福嶋 五月
ローマ字氏名：Fukushima Satsuki
所属研究機関名：国立研究開発法人国立循環器病研究センター
部局名：病院
職名：医長
研究者番号（8桁）：80596867

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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。